

Aus dem Institut für Virologie
Direktor: Prof. Dr. Stephan Becker
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**STÖRUNG DES ZELLULÄREN
NUKLEOZYTOPLASMATISCHEN TRANSPORTS
DURCH DEN VIRULENZFAKTOR NSS DES
RIFTTALFIEBER VIRUS**

**Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat)**

aus dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Simone Lau
aus Memmingen

Marburg, 2020

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
08.12.2020

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan i.V. der Prodekan: Prof. Dr. R. Müller

Referent: Prof. Dr. F. Weber

Korreferent: Prof. Dr. U. Steinhoff

„If we knew what it was we were doing, it would not be called research, would it?“

Albert Einstein

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	V
1 Zusammenfassung	1
2 Summary	3
3 Einleitung	4
3.1 Das Rifttalfieber Virus	4
3.1.1 Transmissionszyklus und Pathogenese	4
3.1.2 Aufbau und Genomorganisation	5
3.1.3 Replikationszyklus	6
3.2 Antivirale Zellantwort auf RVFV Infektion	8
3.2.1 Das Interferonsystem	8
3.2.2 Die Translationskontrolle unter RVFV-Infektion	12
3.3 Die Virulenzfaktoren des RVFV.....	13
3.3.1 Das NSm und das 78-kDa-Protein.....	14
3.3.2 Das NSs des RVFV	14
3.3.3 NSs und die Transkription	15
3.3.4 Das NSs und die Translation	17
3.4 Nukleozytoplasmatischer Transport	18
3.4.1 Der Kernporenkomplex.....	19
3.4.2 Die Grundlagen des nukleozytoplasmatischen Transportes	21
3.4.3 Der mRNA-Export.....	23
4 Ziele dieser Arbeit.....	27
5 Material	28
5.1 Viren	28
5.2 Zellkultur von eukaryotischen Zellen	29
5.2.1 Eukaryotische Zellen	29
5.2.2 Reagenzien	29
5.2.3 Medien und Lösungen	30
5.3 Zellkultur von prokaryotischen Zellen	30
5.3.1 Prokaryotische Zellen	30
5.3.2 Medien und Lösungen	31
5.4 Antikörper	32
5.5 Oligonukleotide	35
5.5.1 Primer für quantitative Realtime-PCR	35

5.5.2	Primer für Sequenzierungen	36
5.5.3	Small interfering RNA (siRNA)	37
5.6	DNA-Plasmide	38
5.7	Enzyme und Längenstandards.....	39
5.8	Kits	40
5.9	Puffer und Lösungen.....	40
5.10	Chemikalien, Reagenzien und Verbrauchsmaterialien	42
5.11	Geräte und Software	45
6	Methoden.....	47
6.1	Virologische Methoden	47
6.1.1	Virusproduktion	47
6.1.2	Titerbestimmung mittels Plaque-Assay	47
6.1.3	<i>Immunofocus assay</i> für Titerbestimmung	48
6.1.4	Virusverifizierung	49
6.1.5	Infektion eukaryotischer Zellen	49
6.1.6	Arbeiten in BSL-3	49
6.2	Zellkultur eukaryotischer Zellen.....	50
6.2.1	Kultivieren von eukaryotischen Zellen.....	50
6.2.2	Transiente Transfektion von eukaryotischen Zellen	50
6.2.3	Mykoplasmentest.....	51
6.3	Zellkultur von prokaryotischen Zellen	52
6.3.1	Herstellung kompetenter Bakterien (DH10B)	52
6.3.2	Transformation und Selektion von Plasmid-DNA	53
6.4	Molekularbiologische Methoden.....	53
6.4.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	53
6.4.2	DNA-Aufreinigung.....	53
6.4.3	RNA-Aufreinigung.....	54
6.4.4	Quantitative <i>Real-Time-PCR</i>	54
6.5	Proteinbiochemische Methoden	55
6.5.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	55
6.5.2	Antikörperfärbung	56
6.6	Immunfluoreszenz-Analyse	57
6.6.1	Indirekte Immunfluoreszenz-Analyse	57
6.6.2	Oligo(dT)- <i>in situ</i> Hybridisierung	57
6.7	Heterokaryon-Assay	58
6.8	Ko-Immunoprecipitation	59
6.9	Kern-Zytoplasma Fraktionierung	60
6.10	<i>Renilla-Luciferase Assay</i>	60

7	Ergebnisse	62
7.1	RVFV-NSs induziert einen mRNA Exportblock	62
7.2	Nup98 und Rae1	64
7.2.1	Lokalisierung und Level von Nup98 und Rae in RVFV-infizierten Zellen	64
7.2.2	Überprüfung der Interaktion von RVFV NSs mit Nup98 und Rae1 ...	65
7.2.3	Bedeutung von Nup98 und Rae1 für die RVFV-Infektion	67
7.3	mRNA Exportfaktoren	70
7.3.1	Bedeutung von NXF1 für eine RVFV-Infektion	73
7.4	Die Kernpore als Angriffspunkt für das RVFV-NSs	76
7.4.1	Das RVFV NSs verlagert Bestandteile der Kernpore in das Zytoplasma	76
7.4.2	RVFV NSs re-lokalisiert Nup214 und Nup358	80
7.4.3	Bedeutung von Nup214 für eine RVFV-Infektion	83
7.4.4	NSs Phänotypisierung	84
7.5	Andere NSs-Proteine induzieren ebenfalls einen mRNA-Exportblock	87
7.5.1	LACV-NSs-unabhängige Induktion des mRNA Exportblocks	88
7.6	Einfluss von RVFV-NSs auf den Proteintransport	94
7.6.1	Einfluss von Leptomycin B und Ivermectin auf eine RVFV-Infektion	94
7.6.2	Nukleozytoplasmatischer Transport in infizierten Zellen	97
7.6.3	Massenspektrometrische Analyse fraktionierter RVFV-infizierter Zellen	99
8	Diskussion	105
8.1	Multifaktorielle Induktion eines mRNA-Exportblocks durch NSs	105
8.1.1	NSs-Interaktion mit Nup98 und Rae1	106
8.1.2	RVFV-NSs manipuliert mRNA-Exportfaktoren	107
8.1.3	RVFV-NSs führt zu Umlagerungen von Nukleoporinen	109
8.1.4	NSs-Phänotypisierung und Modell	110
8.1.5	<i>Bunyavirales</i> -NSse induzieren auf unterschiedliche Weise einen mRNA-Exportblock	113
8.2	Proteintransport	115
8.2.1	Umlagerungen von Proteinen durch RVFV NSs	116
8.3	Ausblick	121
9	Literaturverzeichnis	123
10	Abbildungsverzeichnis	144
11	Tabellenverzeichnis	146
12	Anhang	147
12.1	Ergänzende Daten	147

12.1.1 Zu Kapitel 7.4.4	147
12.1.2 Zu Kapitel 7.6.3	149
12.2 Lebenslauf	150
12.3 Verzeichnis akademischer Lehrer	151
12.4 Publikationen und Tagungsbeiträge	152
12.4.1 Publikationen	152
12.4.2 Tagungsbeiträge	153
13 Danksagung	155
14 Ehrenwörtliche Erklärung	156

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
ActD	Actinomycin D
AL	Annulate Lammellae
APS	Ammoniumperoxosulfat
BHK	<i>baby hamster kidney</i>
BSL-3	<i>Biosafety level 3</i>
CAK	CDK-aktivierender Kinasekomplex
CBP	CREB-Bindeprotein
cDNA	<i>Complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
CHX	Cycloheximide
CPE	<i>Cytopathic effect</i> (zytopathischer Effekt)
cRNA	<i>Complementary RNA</i> (komplementäre RNA)
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid
dATP	Desoxyadenintriphosphat
DC-SIGN	<i>Dendritic-cell specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
eIF2	Eukaryotischer (Translations-) Initiationsfaktor 2
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FBXO3	F-Box-Protein 3
FBXW11	<i>F-box and WD repeat domain protein 11</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
FG	Phenylalanin-Glycin

FRAP	<i>fluorescence recovery after photobleaching</i>
HeLa	Henrietta Lacks
IFN	Interferon
IFNAR	Interferon alpha/beta Rezeptor
ILK	<i>Integrin-linked kinase</i>
ISG	Interferon-stimuliertes Gen
ISRE	Interferon-stimulierte <i>Response</i> -Elemente
Kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KLSM	Konfokales Laseraster Mikroskop
LACV	La Crosse-Enzephalitis Virus
LB	Luria Broth
L-SIGN	<i>liver/lymph node-specific intracellular adhesion molecule-3-grabbing integrin</i>
M	Mol
min	Minuten
ml	Milliliter
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
MOPS	3-(N-morpho-lino)propanesulfonic acid
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
MyD88	Myeloid differentiation primary response gene 88
NES	<i>nuclear export sequence</i>
ng	Nanogramm
NLS	<i>nuclear localisation sequence</i>
NPC	<i>Nuclear pore complex</i>
NSm	<i>Non-structural protein encoded on the M segment</i>
NSs	<i>Non-structural protein encoded on the S segment</i>
nt	Nukleotid
NTR	nukleare Transportrezeptoren

Nup	Nucleoporin
OD	Optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PEG	Polyethylenglycol
PFA	Paraformaldehyd
PFU	<i>Plaque forming unit</i>
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i>
PTV-A	Punta Toro Virus Adames
PTV-B	Punta Toro Virus Balliet
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	Quantitative <i>realtime</i> PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RNP	Ribonucleoprotein
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptions-PCR
RVFV	Rifttalieber-Virus (engl.: <i>Rift Valley Fever Virus</i>)
SAP30	Sin3A-assoziiertes Protein 30
SDS	sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
sec	Sekunde
SFSV	<i>Sandfly fever Sicilian Virus</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
ss	<i>Single-stranded</i>
SSC	<i>saline-sodium citrate</i> (Kochsalzlösung-Natriumcitrat)
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie

TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylethylendiamin
TFIIH	genereller Transkriptionsfaktor IIH
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
T-PER	<i>Tissue Protein Extraction Reagent</i>
U	Unit
UTR	<i>untranslated region</i>
WT	Wildtyp
YY1	Repressorprotein Ying Yang 1
Z-VAD-fmk	Carbobenzoxy-Valyl-Alanyl-Aspartyl-[O-Methyl]- Fluoromethylketon

1 Zusammenfassung

Das Rifttalfeber Virus (engl.: *Rift Valley Fever Virus*, RVFV) gehört zur Gattung *Phlebovirus* innerhalb der Familie *Phenuiviridae* und infiziert vorwiegend Wiederkäuer. Dort verursacht es unter anderem fötale Missbildungen, Fehlgeburten oder ein letales, hämorrhagisches Fieber. Im Menschen führt das RVFV überwiegend zu milden Fiebererkrankungen. In wenigen Fällen kommt es jedoch zu schwereren Krankheitsverläufen mit Hepatitis, Retinitis oder auch einem letalen hämorrhagischen Fieber.

Das RVFV repliziert im Zytoplasma, wobei die infizierten Zellen nicht mehr in der Lage sind, eine effektive Immunantwort zu induzieren, was dem Virulenzfaktor NSs geschuldet ist. Das RVFV NSs unterdrückt die Transkription der Wirtszelle durch den Abbau der Untereinheiten p62 und p44 des Transkriptionsfaktors TFIIF, und inhibiert zusätzlich die Interferon- β -Promoter-Aktivierung. Zudem vermittelt NSs den proteasomalen Abbau der Proteinkinase PKR, wodurch die virale Translation nicht mehr durch PKR gestoppt werden kann. Da eine Inaktivierung dieser NSs-Funktionen die Genexpression der Wirtszelle jedoch nicht vollständig wiederherstellt, wird vermutet, dass NSs weitere Mechanismen besitzt, um die Interferonantwort zu unterdrücken.

Diese Arbeit legt weitere Funktionen des RVFV-NSs offen. Es induziert eine Retention von mRNA im Zellkern, wodurch weniger zelluläre mRNAs mit der viralen RNA um die Translationsmaschinerie konkurrieren. In diesem Zusammenhang offenbarte sich, dass NSs spezifisch eine Umverteilung und möglicherweise eine Blockade des mRNA-Exportrezeptor NXF1 verursacht. Darüber hinaus wird ein Einfluss des NSs auf Kernporenkomplexe (NPCs) beschrieben. So führt eine RVFV-Infektion zu einer Umverteilung von Nup214 und Nup358 aus dem NPC in das Zytoplasma, was womöglich die Translokation und die gerichtete Freisetzung der mRNPs beeinflusst. Ebenfalls wurde demonstriert, dass NSs auch Bestandteile des NPCs benötigt, da der Import von NSs in den Zellkern bei einer Nup98-Depletion gestört ist und die Virus-Titer zurückgehen.

Obwohl Nup214 und Nup358 für den Proteinimport der Zelle benötigt werden, scheint diese Funktion von einer RVFV-Infektion nicht beeinträchtigt zu sein. Das RVFV induziert eher eine Umverteilung spezifischer Proteine. Experimente dieser Arbeit legen dar, dass insbesondere Proteine des Spliceosoms umverteilt werden. Dies impliziert, dass eine RVFV-Infektion in das Spleißen eingreifen könnte.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass ein induzierter mRNA-Exportblock nicht exklusiv für RVFV NSs ist, sondern auch weitere Viren der Ordnung *Bunyavirales* die

mRNA im Zellkern zurückhalten. Allerdings scheinen sich die Mechanismen im Vergleich zu RVFV zu unterscheiden: das La Crosse Virus (LACV) kann auch unabhängig von NSs einen mRNA-Exportblock induzieren. Dies geschieht durch den Integritätsverlust des NPCs und den Abbau von Exportfaktoren, wobei dies womöglich indirekt durch die Induktion der Apoptose vermittelt wird.

2 Summary

Rift Valley fever virus (RVFV, genus: *Phlebovirus*, family: *Phenuiviridae*) mostly infects ruminants where it causes fetal malformations, abortions or a lethal hemorrhagic fever. In humans, RVFV causes a mild, febrile disease. In some cases, however, it can progress to severe disease with hepatitis, retinitis or hemorrhagic fever.

RVFV infected cells are no longer capable to mount an effective immune response due to the virulence factor NSs. It suppresses host cell transcription by degrading the p62 and p44 subunits of the general transcription factor TFIID and inhibits interferon- β -promoter activation. Moreover, NSs targets the protein kinase PKR for proteasomal degradation, which leads to ongoing viral translation. Since inactivating these NSs functions does not rescue host gene expression, NSs may engage additional strategies to stall an effective interferon response.

This work elucidates additional functions of RVFV NSs. It induces a retention of host cell mRNA in the nucleus, which reduces the competition for viral RNA for the translation machinery. In this regard, the mRNA export receptor NXF1 exhibited a redistribution and perhaps blockade upon infection. Furthermore, NSs affects the nuclear pore complex (NPC). RVFV NSs causes a redistribution of Nup214 and Nup358 from the NPC into the cytoplasm, which may affect translocation and directed release of mRNPs. In turn, NSs needs components of the NPC, since NSs import into the nucleus is defective and viral titers decrease upon Nup98 depletion.

Although Nup214 and Nup358 are also involved in protein import, this function is unaffected by RVFV infection. RVFV rather induces the dislocation of specific proteins. In particular, components of the spliceosome were dislocated, indicating an impact of RVFV infection on cellular splicing events.

Moreover, the ability to block mRNA export is not exclusive for RVFV NSs since it was also observed for other members of the order *Bunyavirales*. However, this seems to be mediated by different mechanisms, since this work revealed that La Crosse Virus (LACV) induces an mRNA export block independent of NSs. This is most likely due to an NPC integrity loss and the degradation of mRNA export factors induced indirectly by apoptosis.

3 Einleitung

3.1 Das Riftalfieber Virus

Das Riftalfieber Virus (engl. *Rift Valley Fever Virus*, RVFV) gehört zum Genus *Phlebovirus* innerhalb der Familie der *Phenuiviridae* (ICTV, 2020). Es verursacht das Riftalfieber in einer Vielzahl von Tieren aber auch im Menschen (42). Das Virus wurde zum ersten Mal 1930 im Riftal in Kenia beschrieben und hat sich mittlerweile weiter in Afrika verbreitet (41). Im Jahr 2010 kam es auf der Arabischen Halbinsel erstmals zu einem Ausbruch außerhalb Afrikas.

3.1.1 Transmissionszyklus und Pathogenese

Moskitos der Gattung *Aedes* und *Culex* werden als Hauptvektoren betrachtet, wobei über 30 verschiedene Moskitospezies mit RVFV infiziert sind (157). Darüber hinaus werden weitere Arthropoden wie zum Beispiel *Anopheles* und *Mansonia* (170, 188), Gnitzen (*Culicoides spp.*) (134) und andere blutsaugende Insekten (81) als Überträger in Betracht gezogen. Für den Menschen stellt der direkte Kontakt mit infizierten Tieren oder virämischen Flüssigkeiten den Hauptweg der Infektion dar (31, 115).

Das RVFV kann von weiblichen Moskitos über die Eier auf ihren Nachwuchs übertragen werden, die sogenannte vertikale Transmission. Unter trockenen Bedingungen kann das Virus für mehrere Jahre in den Eiern überdauern und bleibt weiterhin infektiös. Bei starken Regenfällen kommt es dann zum vermehrten Schlüpfen neuer infizierter Moskitogenerationen. Mit zunehmenden Moskitopopulationen steigt gleichzeitig das Potential das Virus auf Tiere zu übertragen. Ausbrüche bei Nutztieren führen infolgedessen zu einem verstärkten Umgang mit infizierten Tieren, was das Risiko einer Infektion beim Menschen erhöht (157).

Das Riftalfieber betrifft Wiederkäuer wie beispielsweise Schafe, Ziegen, Rinder und Kamele und zeichnet sich durch Symptome wie Hepatitis oder einem hämorrhagischen Fieber aus (41, 127). In trächtigen Tieren kommt es zu spontanen Fehlgeburten und die Föten zeigen Missbildungen auf. Beim Menschen gehören hohes Fieber, Kopf- und Muskelschmerzen zu den Krankheitssymptomen. In schweren Fällen kann sich dies allerdings zu einer Enzephalitis, Retinitis oder auch zu einem hämorrhagischen Fieber weiterentwickeln (87). In der Regel liegt die Mortalität beim Menschen bei 1%, wobei während Ausbrüchen von einer Sterblichkeitsrate von 10-20% berichtet wird (87).

3.1.2 Aufbau und Genomorganisation

Das RVFV ist ein sphärisches umhülltes Virus mit einem Durchmesser von 80 bis 120 nm und besitzt ein segmentiertes Genom. Das einzelsträngige RNA-Genom gliedert sich in drei Segmente, die abhängig von ihrer Größe, mit S (engl.: *small*), M (engl.: *medium*) und L (engl.: *large*) bezeichnet werden (178). Alle drei Segmente besitzen an ihren 3'- und 5'-Enden sogenannte nicht-translatierte Regionen (engl.: *untranslated regions*, UTRs), die als Promotoren für die virale Transkription und Replikation dienen (91, 109, 154, 214). Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen, dass die UTRs eine so genannte Pfannenstielstruktur aufweisen, die den RNPs ein kreisförmiges Aussehen verleihen (51).

Die Segmente L und M besitzen eine negative Polarität, wohingegen das S-Segment in *ambisense*-Polarität vorliegt. Das S-Segment (1,7 kb) kodiert in negativer Polarität für das Nukleokapsidprotein N, während in positiver Polarität das Nicht-Strukturprotein NSs kodiert ist. Das L-Segment (6,4 kb) kodiert für die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase L, das M-Segment (3,9 kb) kodiert für die Glycoproteine Gn und Gc, sowie für das Nicht-Strukturproteine NSm und das 78-kDa Protein (25, 60, 145, 211). Der offene Leserahmen (engl.: *open reading frame*, ORF) des M-Segments enthält fünf Translationsinitiations-Codons. Das erste und das zweite Startcodon dienen für das 78-kDa Protein bzw. für das NSm Protein, während die Codons drei bis fünf das Gn-Gc Fusionsprotein initiieren. Um die einzelnen Proteine zu erzeugen, werden die Polyproteinvorläufer durch zelluläre Signalasen gespalten (214).

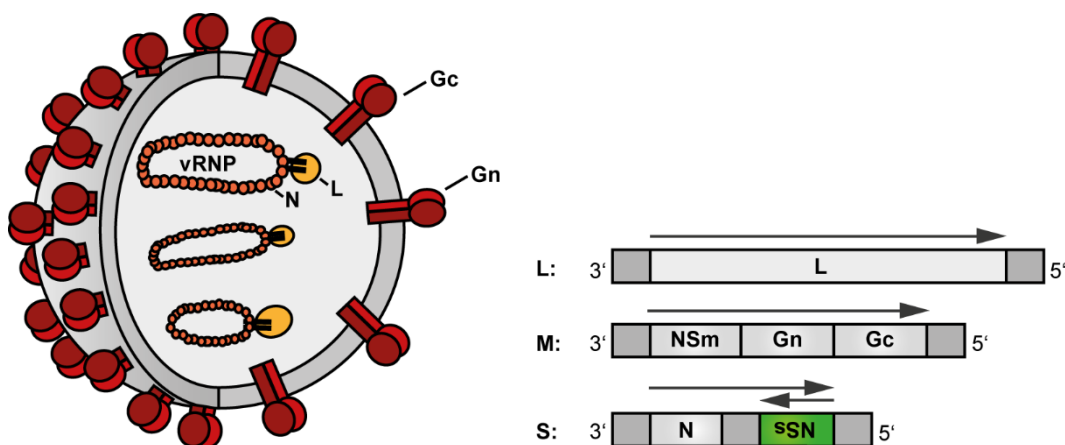


Abbildung 1: Schematische Darstellung des RVFV-Partikels und seines Genoms. **Links:** Die drei enkapsidierten Gensegmente, die mit dem Nukleoprotein N und der Polymerase L assoziiert sind. In die Virusmembran sind die Glykoproteine Gc und Gn eingelassen. **Rechts:** Genomorganisation von RVFV: das einzelsträngige RNA-Genom besteht aus drei Segmenten (L, M und S), die für die Polymerase L, die Glycoproteine Gc und Gn, die Nicht-Strukturproteine NSm und NSs sowie das Nukleokapsidprotein N kodieren.

Die RNA-Moleküle sind mit den N-Proteinen und einem L-Protein assoziiert und bilden sogenannte Ribonukleoproteinpartikel (vRNP), die von der Virushülle umgeben werden. Die Virushülle besteht aus einer Lipiddoppelschicht, in der die Glykoproteine Gc und Gn eingelagert sind (56, 84, 198, 228).

3.1.3 Replikationszyklus

Der erste Schritt des RVFV-Infektionszyklus beinhaltet das Anhaften und den Eintritt des Virus in die Wirtszelle. Als Rezeptor für RVFV wird das Lektin DC-SIGN (engl.: *dendritic cell-specific intracellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin*) gehandelt, das auf dendritischen Zellen exprimiert wird (123). Da das RVFV allerdings weitere Zelltypen infiziert, scheinen noch zusätzliche Moleküle als Rezeptor zu fungieren. Dementsprechend konnte gezeigt werden, dass Heparansulfate (44), Glycosaminglycane (177) und das Lektin L-SIGN (engl.: *liver/lymph node-specific intracellular adhesion molecule-3-grabbing integrin*) (119) ebenfalls für einen Eintritt in die Zelle wichtig sind.

Der Eintritt in die Zelle verläuft über die rezeptorvermittelte Endozytose, die sowohl durch Caveolin-1 (76) als auch durch Clathrin (45) vermittelt wird. Der niedrige pH-Wert des späten Endosoms führt zu einer Konformationsänderung der Glykoproteine, welche die Fusion der viralen Membran mit der endosomalen Membran und somit auch die Freisetzung der RNPs in das Zytoplasma ermöglicht (45).

Nach der Freisetzung der RNPs erfolgt die Primärtranskription der Genomsegmente in mRNA durch die virale Polymerase L. Da die Transkription Primer-abhängig ist, macht sich das Virus den Mechanismus des *CAP-snatching* (engl. „*snatch*“: schnappen) zu Nutze. Durch die Endonuklease-Aktivität der RNA-Polymerase L wird hier eine Sequenz von 10 bis 20 Nukleotiden vom 5'-Ende der Wirts-mRNA abgespalten und als Primer für die eigene virale mRNA-Synthese verwendet (122, 156, 172). Die viralen mRNAs werden dann in Proteine translatiert, wobei die neu hergestellten N und L Proteine die nachfolgende RNA-Replikation initiieren. Hierbei synthetisiert die Polymerase das Antigenom, das als Matrize für die Synthese des Genoms dient. Bei dem Antigenom handelt es sich um eine exakte Kopie des Genoms (*copyRNA*, *cRNA*). Die Synthese erfolgt im Zytoplasma, wobei keine Polyadenylierung der viralen mRNA erfolgt. Allerdings besitzen die 5'-Enden der Gensegmente Triphosphate, die von der Zelle erkannt werden können, um einen antiviralen Zustand zu induzieren (69).

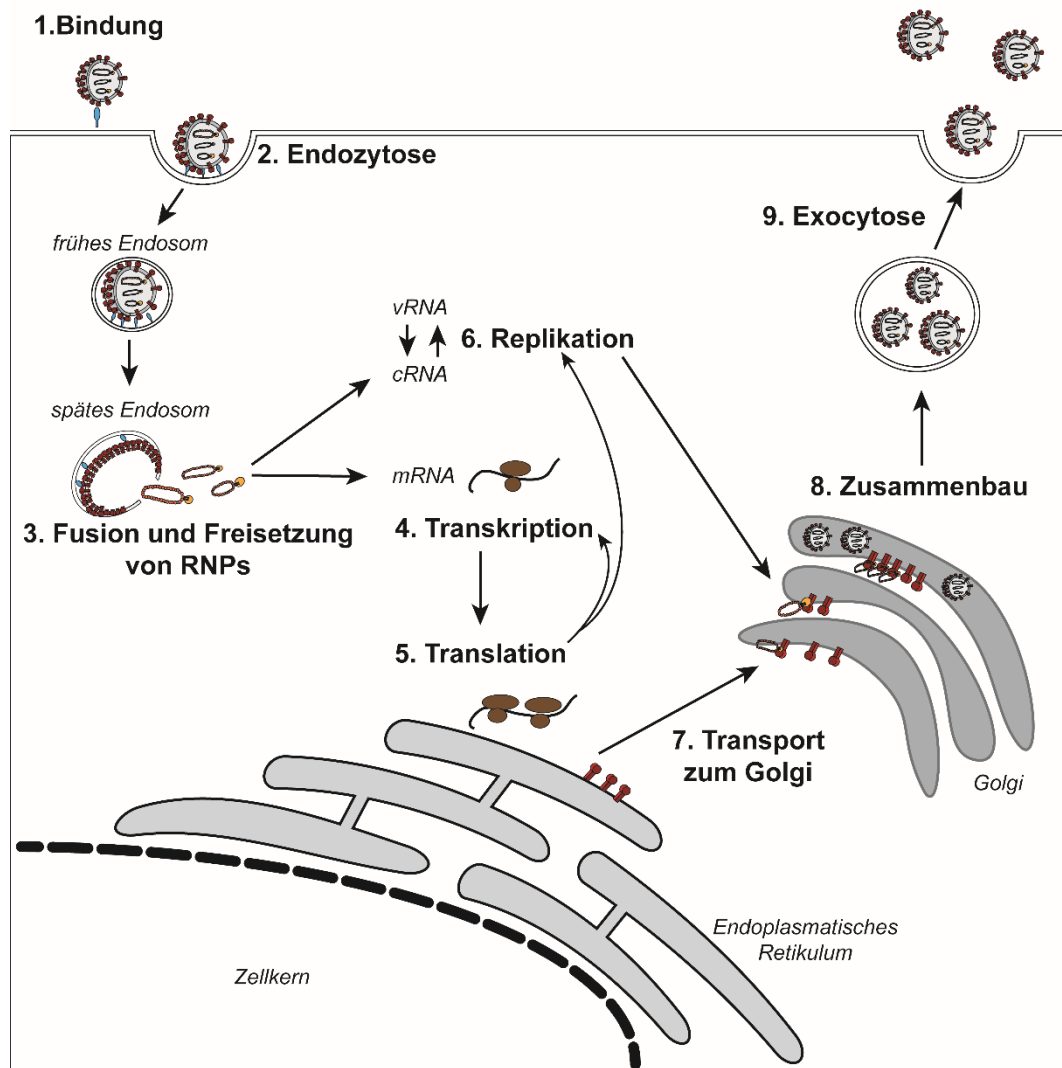


Abbildung 2: Schematische Darstellung des RVFV Replikationszyklus. Nach der Bindung des Virus werden die RVFV Partikel über Endozytose in die Zelle aufgenommen. Die Ansäuerung im Endosom führt zur Konformationsänderung der Glykoproteine was die Fusion der endosomalen Membran mit der viralen Membran zur Folge hat. Die RNPs werden so in das Zytoplasma freigelassen wo sie als Vorlage für Transkription und Replikation dienen. L- und S-Segment-encodierte mRNAs werden durch freie Ribosomen translatiert, während M-Segment-encodierte mRNAs durch membrangebundene Ribosomen am endoplasmatischem Retikulum (ER) translatiert werden. Alle Strukturproteine und RNPs werden zum Golgi transportiert, wobei durch Knospung in das Lumen Virionen gebildet werden. Reife Virionen werden dann durch Exozytose freigesetzt. Modifiziert nach Fields, Virology (192).

Für die Formation neuer Viruspartikel sind die Glykoproteine Gc und Gn essentiell (162). Durch die Verwendung alternativer *In-frame*-Startcodons wird ein Vorläufer für die Glykoproteine mit den akzessorischen Proteinen NSm und 78-kDa Protein aus der M-Segment-mRNA translatiert (35, 214). Dieser wird an der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) translatiert und durch Signalpeptidasen gespalten (60). Gc und Gn wandern dann durch ein Lokalisierungssignal zu dem Golgi-Apparat (30, 59, 231). Die N- und L-Proteine, sowie die Gensegmente werden für die Viruszusammensetzung von Gn rekrutiert (162). Nach der Rekrutierung erfolgt die

Abknospung einer sehr heterogenen Population von Virionen, die verschiedene Mengen und Arten von Genomsegmenten enthalten, in das Golgi-Lumen (237). Virionen mit mindestens einem S, M und L Segment können bei der Infektion Nachkommen produzieren. Alternativ kann eine Koinfektion mit sich komplementierenden Partikeln zu einer produktiven Infektion führen. Durch die Absprossung in den Golgi-Apparat erhält das RVFV eine Lipidmembran wobei die Freisetzung an der Plasmamembran stattfindet (26, 132).

3.2 Antivirale Zellantwort auf RVFV Infektion

3.2.1 Das Interferonsystem

Die angeborene Immunantwort ist die erste Hürde, die ein Virus umgehen muss. Das Interferonsystem ist Hauptbestandteil der antiviralen Verteidigung und spielt eine wichtige Rolle bei der Limitierung der Virusverbreitung in einem frühen Stadium der Infektion bis die adaptive Immunantwort etabliert wird. Bevor angeborene Immunreaktionen ausgelöst werden können, müssen die Erreger durch Mustererkennungsrezeptoren (engl.: *pattern-recognition receptors*, PRRs) nachgewiesen werden, die spezifische Pathogen-assoziierte molekulare Muster (engl.: *pathogen associated molecular patterns*, PAMPs) erkennen (1). Jeder PRR aktiviert spezifische Signalkaskaden um die Expression von Zielgenen, wie pro-inflammatorische Zytokine und Typ-I-Interferone (engl.: *interferon*, IFN), zu induzieren. IFNs, die von Immunzellen wie Makrophagen oder dendritischen Zellen (engl.: *dendritic cells*, DCs) sekretiert werden, regulieren die Aktivierung der adaptiven Immunität, einschließlich der Reifung von natürlichen Killerzellen und der Differenzierung von zytotoxischen T-Zellen (206). IFNs werden gemäß ihrer Aminosäuresequenz, dem Induktionsmodus, der Rezeptorverwendung und der biologischen Aktivität klassifiziert (204). Typ-I-IFNs werden von Zellen als direkte Antwort auf eine Virusinfektion produziert und umfassen eine große Anzahl von IFN- α -Unterarten und einem einzelnen IFN- β sowie einige zusätzliche Familienmitglieder (179, 223). Typ-II-IFN (IFN γ) wird von Immunzellen produziert und spielt eine wichtige Rolle bei der Immunregulation und bei der viralen Klärung durch T- und NK-Zellen (68, 219). Typ-III-IFN besteht aus vier IFN- λ Molekülen, IFN- λ 1 bis IFN- λ 4 und ist insbesondere wichtig für Organe mit Barrierefunktion wie Lunge oder Darm (163).

3.2.1.1 Das Typ-I-Interferonsystem

In infizierten Zellen wird eine Signalkaskade durch die zytosolischen PRRs RIG-I (engl.: *retinoic acid inducible gene 1*) und MDA5 (engl.: *melanoma differentiation-associated protein 5*) aktiviert, die doppelsträngige RNA (dsRNA), kurze 5'-Triphosphat dsRNA oder das Analog poly(I:C) erkennen (3, 159, 191, 248, 249). RIG-I und MDA5 besitzen beide zwei N-terminale Caspase-rekrutierende Domänen (CARD) und eine C-terminale DExD/H-Box-RNA-Helikase-Domäne (3, 248). Die Bindung von Liganden induziert eine Konformationsänderung, die es ermöglicht, dass die CARD-Domäne mit CARD-ähnlichen Domänen des stromabwärts gelegenen Signalpartners MAVS (engl.: *mitochondrial antiviral signaling*; mitochondriale antivirale Signalübertragung) wechselwirkt. Dies wiederum ermöglicht die Rekrutierung von TRAF2, 5 und 6, die für die weitere Signalübertragung notwendig sind. Die Kinasen TBK1 und IKK ϵ phosphorylieren und aktivieren anschließend IRF3, was dessen Dimerisierung und Transport in den Zellkern zur Folge hat. Dort rekrutiert es die transkriptionellen Coaktivatoren p300 und das CREB-Bindeprotein (CBP), um die IFN- β mRNA-Synthese zu initiieren (80, 212). Zusätzlich werden die Moleküle NF- κ B und AP-1 in einer dsRNA-abhängigen Weise rekrutiert (33). Zusammen erhöhen diese Transkriptionsfaktoren die IFN- α/β Genexpression. Das anfänglich produzierte IFN löst in benachbarten Zellen durch die Bindung an den IFN- α/β -Rezeptor (IFNAR) die Expression des IRF7 aus (189), wobei IRF7 in gleicher Weise wie IRF3 aktiviert wird (93, 201, 217) und für eine positive Rückkopplungsschleife verantwortlich ist, welche eine zweite Welle von IFN initiiert (129, 190).

Weitere wichtige PRRs sind die sogenannten TLRs (engl.: *Toll-like receptors*), die für die Viruserkennung in Endosomen zuständig sind. Der TLR3 erkennt virale dsRNA sowie poly(I:C), die Rezeptoren TLR7 und TLR8 erkennen ssRNA (48, 79, 124). Zudem signalisiert der TLR3 über das Adapter-Molekül TRIF, welches MAVS umgeht und direkt die Kinase TBK-1 aktiviert. Dieser RIG-I unabhängige Weg führt ebenso zur Aktivierung von IRF3, NF- κ B und AP-1 und folglich zur Expression des Typ-I-IFN (136). Nach Aktivierung von TLR7 und TLR8 signalisieren diese über ihr Adapter-Molekül MyD88, das einen Komplex mit TRAF6 und dem IRF-7 bildet. IRF-7 wird durch IRAK-1, eine zusätzliche Komponente dieses Rezeptor-assoziierten Multiproteinkomplexes, phosphoryliert und aktiviert mehrere IFN- α -Gene (64, 94).

IFN- α/β binden und aktivieren einen gemeinsamen Typ-I-IFN-Rezeptor der aus den Untereinheiten IFNAR-1 und IFNAR-2 besteht (187, 204). Die Bindung von IFN führt zur Heterodimerisierung der IFNAR-Untereinheiten und zu Konformationsänderungen in den intrazellulären Teilen des Rezeptors, die den JAK/STAT-Signalweg aktivieren. Die

STAT-Proteine sind latente zytoplasmatische Transkriptionsfaktoren, die von den Janus-Kinase (JAK)-Familienmitgliedern JAK-1 und TYK-2 (204) an spezifischen Tyrosinresten phosphoryliert werden. Phosphoryliertes STAT-1 und STAT-2 rekrutieren den IRF-9, um einen Komplex zu bilden, der als IFN-stimulierter Genfaktor 3 (ISGF-3) bekannt ist. ISGF-3 transloziert in den Kern und bindet an IFN-stimulierte *Response*-Elemente (ISRE) in der Promotorregion von IFN-stimulierten Genen (ISGs) und induziert dadurch deren Transkription. Diese ISGs, wie z.B. PKR, Mx oder OAS, sind entweder Signaltransduktoren oder haben direkte antivirale Aktivitäten (72, 247).

3.2.1.2 Typ-II-Interferone

Das Typ-II-IFN, auch bekannt als IFN- γ , signalisiert über einen anderen Rezeptor und hat Effekte, die unabhängig von Typ-I-IFN sind. Allerdings wird es hauptsächlich als immunmodulatorisches Zytokin angesehen (163). Im Zusammenhang mit einer Virusinfektion spielt IFN- γ eher eine unterstützende Rolle, da es im Vergleich zum Typ-I-IFN weniger potent ist. Aus diesem Grund, und da es im Kontext einer RVFV eine vernachlässigbare Rolle spielt (25), wird es hier nicht detaillierter beschrieben.

3.2.1.3 Typ-III-Interferone

Das Typ-III-IFN-System beinhaltet die Interferone IFN- λ 1, IFN- λ 2, IFN- λ 3 und IFN- λ 4 die auf Transkriptionsebene reguliert werden (73, 110, 166, 197). Ihre Expression hängt von den intrazellulären Sensoren der Virusinfektion und deren nachgeschalteten Molekülen wie TLR3, RIG-I, TBK1 und IRF ab, die ebenfalls die Typ-I-IFN-Produktion regulieren. IFN- λ binden und aktivieren den heterodimeren Rezeptorkomplex IFN- λ R1 welcher, wie IFNAR, über den JAK/STAT-Signalweg signalisiert und somit die Transkription von ISGs aktiviert (110, 151, 197). Trotz der offensichtlichen Ähnlichkeiten zwischen den beiden Interferonsystemen zeigen neuere Studien unterschiedliche Effekte der beiden Systeme. In Abhängigkeit vom untersuchten Zelltyp können Typ-I- und Typ-III-IFN differenzielle Expressionsmuster von ISGs vermitteln (92, 196). Ebenso scheinen beide Systeme eine unterschiedliche Induktionskinetik aufzuweisen, wobei das IFN- α eine schnellere, aber vorübergehende ISG Expression induziert, während die Effekte von IFN- λ verzögert sind, aber länger anhalten (24, 128). Des Weiteren induziert das Typ-I-IFN eine robuste ISG-Expression in vielen Geweben wie Leber, Milz und Niere, während Typ-III-IFN eher auf Organe mit Schleimhautoberflächen wie die Lunge oder den Gastrointestinaltrakt wirkt (139, 203).

3.2.1.4 Die Aktivierung des Interferon-Systems durch das RVFV

Das RVFV produziert während der Infektion keine wesentlichen Mengen an dsRNA (233, 253) dennoch ist die nackte Virion-RNA ein starker RIG-I-Aktivator, da sie eine 5'-triphosphorylierte dsRNA-Pfannenstilstruktur an den Genenden ausbildet (69). RIG-I ist sogar in der Lage, 5'ppp-RNA des einkommenden RNPs (234) zu erkennen. Von Ermler *et al.* wurde im Kontext des RVFV gezeigt, dass eine Signalgebung unterhalb von RIG-I, aber nicht von TLRs für die Induktion von Typ-I-IFN *in vivo* notwendig ist. Zudem, scheint MDA5 nur eine geringe Rolle in der IFN-Induktion zu spielen (52).

Im Zusammenhang mit dem Typ-II-Interferonsystem konnte gezeigt werden, dass IFN- γ im Serum infizierter Ziegen nachzuweisen ist und einen schützenden Effekt auf Rhesus Makaken hat. Die antivirale Wirkung in Zellkultur ist allerdings nur sehr schwach und spielt im Mausmodel eine vernachlässigbare Rolle (25, 71, 140, 145, 149).

In Patientenproben von drei infizierten ugandischen Männern konnte, im Vergleich zu den Kontrollen, ein erhöhter Spiegel an IFN- γ und IFN- λ 1 nachgewiesen werden. Allerdings kann in dieser Studie nicht ausgeschlossen werden, dass die Werte auf anhaltende Immunaktivierung oder wegen zugrundeliegender Unterschiede in der ugandischen gegenüber der nordamerikanischen Bevölkerung zurückzuführen sind und nicht im Zusammenhang mit dem Krankheitsverlauf stehen (46). Im Gegensatz zur Verabreichung von Typ-I-IFN scheinen Typ-III-IFN keine schützende Wirkung gegen das RVFV zu haben (138, 141).

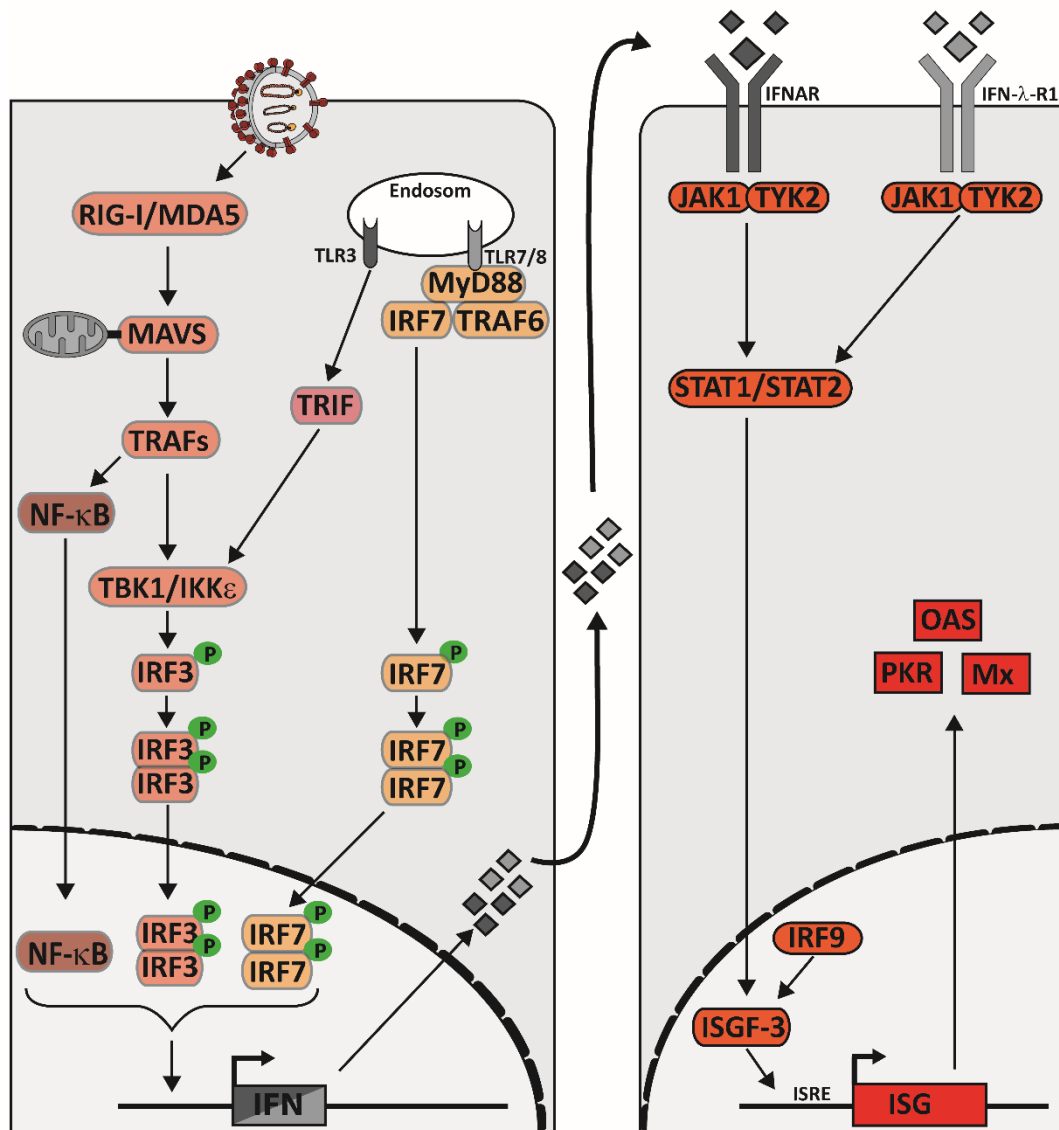


Abbildung 3: Induktion des Typ-I- und Typ-III-Interferonsystems durch virale RNA. Sowohl die Erkennung von viraler RNA durch RIG-I und MDA5 im Zytoplasma, als auch die Erkennung von ssRNA und dsRNA durch TLR3 und TLR7/8 im Endosom lösen die IFN Signalkaskaden aus. Dies führt zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF-κB, IRF-3 und IRF-7, welche in den Zellkern transportiert werden und dort die IFN-Transkription aktivieren. Sekretiertes Typ-I- und Typ-III-IFN bindet an seine spezifischen Rezeptoren und aktiviert eine gemeinsame Signalkaskade, welche die Transkription von ISGs auslöst.

3.2.2 Die Translationskontrolle unter RVFV-Infektion

Viren sind bedingungslos von der Translationsmaschinerie ihres Wirts abhängig. Daher wird durch leistungsfähige Abwehrmechanismen der Wirtszellen der Zugriff auf den Translationsapparat so überwacht, dass sie virale Eindringlinge einschränken können (205).

Der eukaryotische Initiationsfaktor 2 (eIF2) spielt eine essenzielle Rolle in der mRNA-Translation und deren Regulation. Zu Beginn vermittelt ein eIF2 mit gebundenem GTP

die Bindung der Initiator-tRNA (methionyl tRNA; Met-tRNA_i) an das Ribosom. Nach der Erkennung des Start-Codons wird das gebundene GTP zu GDP hydrolysiert und der resultierende eIF2-GDP-Komplex verlässt das Ribosom. Um zu seinem aktiven GTP-gebundenen Zustand zurückzukehren, benötigt eIF2 den eIF2B Komplex, welcher den GDP-Austausch zu GTP vermittelt und somit eine weitere Runde der Translationsinitiation ermöglicht. Veränderungen der Aktivität von eIF2B modulieren die Gesamtraten der Proteinsynthese so, dass die Translationsinitiation gestoppt werden kann. Die Phosphorylierung der eIF2-Untereinheit α resultiert in eIF2(α P), einem starken kompetitiven Inhibitor von eIF2B. Der von eIF2B vermittelte Nukleotidaustausch kann durch die folgenden Kinasen inhibiert werden: Die Kinase HRI (engl.: *heme-regulated inhibitor*) vermittelt die eIF2 α -Phosphorylierung als Reaktion auf einen Hitzeschock und einen oxidativen Stress, wobei die Kinase GCN2 (engl.: *general control non-derepressible*) durch die Ansammlung von unbeladener tRNA aktiviert wird. Die Kinase PERK (engl.: *PKR-like endoplasmic reticulum kinase*) wird durch ungefaltete Proteine im ER induziert (135, 167). PKR ist ein PRR der sowohl dsRNA als auch 5'ppp-ssRNA mit kurzen *Stem-Loops* erkennt (49, 148). Zusätzlich kann das ISG PKR durch das Protein PACT und die Caspasen 3,7 und 8 aktiviert werden (155, 185).

Viele Viren haben Mechanismen entwickelt, diesen Kinasen entgegenzuwirken, um so einen Translationsstopp zu verhindern (205). Im Falle des RVFV scheint die PKR die relevante eIF2 α -Kinase zu sein. Es konnte gezeigt werden, dass die PKR während einer RVFV-Infektion aktiviert wird und als starker Restriktionsfaktor wirkt. Allerdings kann das RVFV den PKR-Signalweg inhibieren und somit eine eIF2 α -Phosphorylierung verhindern, bzw. zeitlich verzögern (71, 88). Auf den genauen Mechanismus wird im Kapitel 3.3.4 eingegangen.

3.3 Die Virulenzfaktoren des RVFV

Um die Erkennung durch die Wirtszelle zu umgehen und um gut in der Zelle replizieren zu können, haben Viren ein Repertoire an Evasionsmechanismen entwickelt. Hierbei erfüllt im Allgemeinen ein virales Protein eine Aufgabe, die das Viruswachstum und die Pathogenität stark erhöht. Dieses Protein ist dabei jedoch nicht zwingend für den Replikationszyklus notwendig. Solche Proteine werden daher als Virulenzfaktoren bezeichnet. Im Fall von RVFV sind das die Nicht-Strukturproteine NSs (siehe Kapitel 3.3.2), NSm und das 78-kDa-Protein (siehe Kapitel 3.3.1).

3.3.1 Das NSm und das 78-kDa-Protein

Das NSm und das 78-kDa-Protein werden von dem M-Segment enkodiert. Das 78-kDa-Protein wird aus dem ersten AUG-Codon translatiert und seine Sequenz umfasst die gesamte NSm- und Gn-codierenden Sequenzen. NSm wird in der Region vom zweiten AUG-Codon zum Ende der Prä-Gn-Region übersetzt und lokalisiert an der äußeren mitochondrialen Membran. In der Zellkultur sind das NSm und das 78-kDa-Protein für ein effizientes RVFV-Wachstum, sowohl in IFN-kompetenten als auch IFN-defizienten Zellen, entbehrlich (58, 240). Allerdings konnte in einem Tiermodell gezeigt werden, dass eine Deletion von NSm und 78-kDa-Protein zu einer leichten Abschwächung des Virus führt (15). Won *et al.* demonstrierten, dass Zellen, die mit einer NSm-Deletionsmutante infiziert wurden, schneller in den programmierten Zelltod übergingen als Zellen, die mit dem parentalen Virus infiziert wurden. Die Daten weisen ebenfalls darauf hin, dass das NSm die Aktivität der Caspase-8 und der Caspase-3 unterdrückt und dies zu einer Verzögerung der Apoptose führt (241).

Im Gegensatz zu Säugerzellen scheint das NSm eine wichtige Rolle in Moskitos zu spielen (38, 97). Für eine erfolgreiche Virusübertragung ist es erforderlich, dass das Virus, nachdem es über ein Blutmahl aufgenommen worden ist, in die Epithelzellen des Mitteldarms eindringt und dort repliziert. Anschließend muss das Virus aus den Mitteldarmzellen in die Hämolymphe übertreten, um die Sekundärorgane, einschließlich der Speicheldrüsen, infizieren zu können. Im Speichel angelangt, kann das Virus beim nächsten Blutmahl auf einen neuen Wirt übertragen werden. Eine Deletion des NSm-Gens reduziert signifikant die Infektions- und Übertragungsraten bei *Aedes aegypti* und *Culex quinquefasciatus* Moskitos (38). Kading *et al.* erklären dies damit, dass Viren ohne das NSm nicht in der Lage sind, die Epithelzellen des Mitteldarms zu verlassen, was die verminderte Infektions- und Übertragungsraten erklärt (97). Auf zellulärer Ebene ist bisher noch unbekannt, wie das NSm die Fähigkeit des RVFV fördert, eine Infektion im Mitteldarm zu etablieren und sich zu verbreiten, allerdings betonen die Ergebnisse, dass das RVFV Mittel benötigt, um sowohl im Vektor als auch im Wirt eine produktive Infektion zu etablieren.

3.3.2 Das NSs des RVFV

Das NSs des RVFV besteht aus 265 Aminosäuren, hat eine molekulare Masse von 30 kDa und bildet in den Zellkernen infizierter Zellen charakteristische Filamente mit einem Durchmesser von ca. 0,5 bis 1 μ M (210, 215). Die Filamente scheinen aus Bündeln dicht gepackter, paralleler Fibrillen mit Durchmessern im Bereich von etwa 8 bis 15 nm zusammengesetzt zu sein (9). Diese Fibrillen bestehen wahrscheinlich aus

entweder NSs-Dimeren (245) oder -Tetrameren (9), wobei die Positionen 249 bis 259 für die Selbstassoziation verantwortlich zu sein scheinen (245). Die Casein Kinase II vermittelt Phosphorylierungen des NSs an den an Positionen 252 und 256 befindlichen Serinen; dies sind bisher die einzigen bekannten posttranslationalen Modifikationen (108). Die Phosphorylierung scheint allerdings keinen großen Einfluss auf den Lebenszyklus des Virus zu haben (108, 245).

Vialat *et al.* konnten zeigen, dass das NSs eine wichtige Rolle in der Virulenz des RVFV spielt (224). Dazu generierten sie Reassortanten zwischen dem abgeschwächten Stamm Clone 13, der eine große Deletion in dem NSs-kodierenden Bereich des S-Segments aufweist (146) und dem virulenten Stamm ZH548. Mäuse, die mit Clone 13 oder mit Reassortanten, die das Clone 13-S-Segment enthielten, inokuliert wurden, überlebten die Infektion und zeigten keine klinischen Symptome. Umgekehrt, erreichten Reassortanten, die das L- und M-Segment von Clone 13 und das S-Segment des Stamms ZH548 besitzen, die Letalität des ursprünglichen ZH548. Mittlerweile etablierten mehrere Gruppen ein cDNA-basiertes Virus-Rettungssystem (engl.: *rescue system*), mit dem NSs aus dem viralen Genom deletiert oder ersetzt werden können (70, 90). Mit Hilfe dieser Systeme zeigte sich, dass das NSs für die Viabilität in der Zellkultur entbehrlich ist, eine Deletion von NSs allerdings zu einem verminderten Wachstum führt, insbesondere in Zellen mit einem funktionellen IFN-System (13, 70, 90). Im Zusammenhang mit dem IFN-System konnte ebenfalls demonstriert werden, dass das S-Segment Determinanten trägt, welche die IFN α / β -Produktion im infizierten Wirt beeinflussen. Das NSs-exprimierende ZH548-Virus ist hoch virulent und wächst in Mäusen zu hohen Titern, ohne dabei nachweisbare Mengen an IFN zu induzieren, während der NSs-defekte Clone 13 ein ausgezeichneter IFN-Induktor ist und in IFN-responsiven Mäusen stark abgeschwächt ist (25). Des Weiteren erliegen Mäuse, denen der IFN- α / β -Rezeptor (IFNAR) fehlt, einer Infektion mit Clone 13 schneller als die ZH548-infizierten Kontrolltiere (25). Mit Hinblick auf die zahlreichen Publikationen über das NSs, scheint das NSs offenbar ein multifunktionales Protein zu sein, weshalb im Folgenden näher auf die besonderen Funktionen des NSs eingegangen wird.

3.3.3 NSs und die Transkription

3.3.3.1 Genereller Transkriptionsblock

Le May *et al.* konnten zeigen, dass das RVFV-NSs einen generellen Transkriptionsblock induziert. Dies geschieht durch eine direkte Interaktion des NSs mit Bestandteilen des generellen Transkriptionsfaktors IIH (TFIIH) (117). Dieser Transkriptionsfaktor besteht aus einem Kernkomplex und einem Cyclin-aktivierenden Kinase-Subkomplex (CDK-

activating kinase complex, CAK). Der Kernkomplex besteht aus den Untereinheiten p8, p34, p44, p52, p62 und XBP, während sich der CAK-Komplex aus den Untereinheiten Cyclin H, MAT1 und CDK7 zusammensetzt (255). Der TFIIH bildet zusammen mit den Faktoren TFIIA, TFIIB, TFIID, TFII E, TFIIF den Präinitiations-Transkriptionskomplex für die RNA-Polymerase II. Des Weiteren ist der TFIIH am Promoterschmelzen beteiligt und ermöglicht es der Pol II, vom Promotor über die Cyclin-abhängige Phosphorylierung der großen C-terminalen Domäne der Pol-II-Untereinheit (CTD) aus dem Initiationskomplex in den Elongationskomplex überzugehen. Darüber hinaus wird der TFIIH auch für die RNA-Polymerase-I-vermittelte Transkription benötigt (255).

Die XBP- und p44-Untereinheiten kolokalisieren mit den NSs-Filamenten, wobei nur die p44-Untereinheit direkt mit dem NSs interagiert. Es wird vermutet, dass das NSs um die Bindung zwischen XPD und p44 konkurriert und somit den Zusammenbau des TFIIH-Komplexes verhindert (117). Terasaki *et al.* demonstrierten allerdings, dass die p44-Interaktion mit dem NSs nur einen mäßigen Beitrag zur Transkriptionshemmung liefert, da eine NSs-Mutante (R16H/M250K) zwar mit der p44-Untereinheit interagiert, aber nicht in der Lage ist die Transkription zu hemmen (218).

Kalveram *et al.* wiesen zudem nach, dass das NSs ebenfalls mit der Untereinheit p62 interagiert und anschließend den proteasomalen Abbau dieser Untereinheit induziert (100). Kainulainen *et al.* konnten in diesem Zusammenhang demonstrieren, dass das F-box-Protein FBXO3 mit dem NSs interagiert. FBXO3 und sein Kofaktor Skp1 sind beide Bestandteile einer E3-Ubiquitin-Ligase und für den NSs-induzierten p62-Abbau verantwortlich (98).

3.3.3.2 Der IFN- β -Promotorblock

Neben einem generellen Transkriptionsblock kann das NSs auch spezifisch den IFN- β -Promotor inhibieren. Das NSs interagiert mit dem Sin3A-assoziierten Protein 30 (SAP30) und verstärkt die Unterdrückung des IFN- β -Promotors durch die Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor Yin Yang 1 (YY1). Durch die Bildung des NSs-SAP30-YY1 Komplexes kann das CREB-Bindeprotein nicht mehr an den Promotor rekrutiert werden und die Acetylierung der Histone wird unterdrückt (118). Ferner konnte gezeigt werden, dass eine gezielte Herunterregulation von FBXO3 durch RNA-Interferenz eine Induktion von IFN- β -mRNA während einer RVFV Infektion ermöglicht (98).

3.3.3.3 Andere Promotoren

Das RVFV ist ebenfalls in der Lage, spezifische Gene hoch- oder herunter zu regulieren. So konnte die Bonnefoy-Gruppe zeigen, dass Gene innerhalb der Gerinnungskaskaden NSs-abhängig hochreguliert wurden (11).

Bei einer genomweiten Analyse der Interaktionen zwischen dem NSs und dem Wirtsgenom zeigten Benferhat *et al.*, dass NSs ebenfalls mit Genen interagiert, die in der Zelladhäsion, der axonalen Führung und Entwicklung und dem Wnt-Signalweg involviert sind (11).

In infizierten Zellen kann auch eine DNA-Schadenssignalisierung nachgewiesen werden, die zum Zellzyklusarrest führt. Allerdings kommt es dabei zu keiner DNA-Schädigung (7). Die Infektion führt zu einer Phosphorylierung der Proteine ATM, Chk.2 und p53 und zu einer reduzierten Phosphorylierung von ATR. Die Verwendung von ATM- und Chk.2-Inhibitoren sowie ein p53-Knockdown führten zu einer deutlichen Abnahme des Zellzyklusarrestes und der Virusproduktion (5, 7, 165). Dies deutet darauf hin, dass das NSs Signalwege für DNA-Schäden induziert, welche für die Virusreplikation von Vorteil sind.

Pinkham *et al.* beobachteten in ihren Transkriptomanalysen eine Hochregulation des *Integrin-linked kinase* (ILK)-Signalweges, welcher eine Vielzahl von Akteuren umfasst, die an der Zelladhäsion, der Reorganisation des Zytoskeletts und der Zellmobilität beteiligt sind (161). Ebenfalls weisen die Daten daraufhin, dass dieser Signalweg wichtig für die RVFV-Replikation ist, da eine Inhibierung des Signalweges zu einer verringerten Virusreplikation führt.

3.3.4 Das NSs und die Translation

Die Herunterregulierung der Translation ist ein Schlüsselmechanismus für antivirale Mechanismen (vgl. Kapitel 3.2.2). Hierbei vermittelt die Proteinkinase R (PKR) die Phosphorylierung des eukaryotischen Translationsinitiationsfaktors 2 α (eIF2 α) was zu einer Hemmung der Translation führt. Es konnte gezeigt werden, dass die PKR während einer RVFV-Infektion aktiviert wird und als starker Restriktionsfaktor wirkt. Allerdings kann das RVFV den PKR-Signalweg inhibieren. Die Expression von RVFV-NSs führt zu einem proteolytischen Abbau der PKR und verhindert somit die Phosphorylierung des eIF2 α (71, 88).

Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass PKR antiviral gegen RVFV wirkt. So erreichen Viren, die kein funktionales NSs exprimieren, in PKR^{-/-}-Zellen einen höheren Titer auf als in Zellen die PKR exprimieren. Entsprechend verursacht Clone 13 eine tödliche Infektion

in PKR^{-/-} Mäusen, wohingegen eine Clone 13-Infektion in Wildtyp-Mäusen abgeschwächt verläuft (71). Ikegami *et al.* gehen davon aus, dass die Replikation des RVFV und der einhergehende Transkriptionsblock eine Umgebung schafft, die ungünstig für eine weitere virale Replikation ist, wobei der NSs-vermittelte Abbau der PKR dies wiederum ausgleicht (89). So repliziert das RVFV effizienter in der Anwesenheit der Transkriptionsinhibitoren Actinomycin D (ActD) und α -Amanitin als ohne funktionelles NSs. Des Weiteren führte die Replikation von rMP12-rLuc in Gegenwart des Inhibitor ActD, jedoch nicht in dessen Abwesenheit, zu einer Akkumulation von phosphoryliertem eIF2 α und zu einer verringerten Akkumulation des RVFV N (88, 89). Mechanistisch besteht kein Zusammenhang zwischen dem NSs-vermittelten Transkriptionsblock und dem Abbau der PKR. Die NSs-Mutante R173A ist nicht in der Lage PKR abzubauen, kann allerdings trotzdem die Transkription hemmen (101). Es konnte auch ausgeschlossen werden, dass die reduzierten PKR-Level auf den natürlichen Durchsatz nach der Modulation der Transkription oder der Translation zurückzuführen sind, sondern durch das Proteasom verursacht wird (71). Es konnte gezeigt werden, dass das NSs die E3-Ubiquitin-Ligasekomplexe vom SCF-Typ (Skp1, Cul1, F-Box-Protein) benötigt, um die PKR zu zerstören. Hierbei sind die F-Box-Proteine FBXW11 und das Homolog β -TRCP1 von Nöten (99, 143). Das NSs bindet einerseits über eine sogenannte Degronsequenz an FBXW11 und rekrutiert andererseits PKR über eine alternative Bindungsstelle an die E3-Ligase. Die PKR wird dann durch das E2-Ubiquitin-konjugierendes Enzym der SCF-FBXW11-E3-Ligase ubiquitiniert und anschließend für den proteasomal abgebaut (143).

3.4 Nukleozytoplasmatischer Transport

Die Kernmembran trennt die Synthese von DNA und RNA, die im Zellkern stattfindet, von der Proteinsynthese. Während die Kompartimentierung eine hohe Regulation dieser Prozesse, und somit der Genexpression, ermöglicht, erfordert dies auch die Entwicklung effizienter Mechanismen für den Transport von Makromolekülen zwischen Kern und Zytoplasma. Proteine mit einer Kernfunktion, wie z.B. Transkriptionsfaktoren, müssen in den Zellkern transportiert werden, wobei viele RNA-Klassen in das Zytoplasma transportiert werden müssen, da sie dort entweder an der Translation beteiligt sind oder weil sie sich dort Reifungsprozessen unterziehen.

Der Transport wird durch Transportrezeptoren ausgelöst, die direkt oder indirekt ihre Fracht erkennen, und die Translokation durch die Kernpore in gerichteter Weise vermitteln. Diese Transportprozesse sind daher hochselektiv, denn in der Regel werden nur transportfähige Substrate durch ihre Transportrezeptoren erkannt. In den folgenden

Abschnitten werden die für diese Arbeit wichtigsten Eigenschaften des nukleozytoplasmatischen Transportprozesses näher erläutert.

3.4.1 Der Kernporenkomplex

Der Transport zwischen Zellkern und Zytoplasma ist essentiell für die Zellaktivität und erfolgt über den Kernporenkomplex (engl.: *nuclear pore complex*, *NPC*), der in die Doppelmembran der Kernhülle eingelagert ist (232). Der *NPC* (siehe Abbildung 4) ist nicht nur wichtig für den Transport, sondern ist auch in der Chromatinorganisation, in der Regulation der Genexpression und in der DNA-Reparatur involviert. Er hat eine molekulare Masse von 120 MDa und besteht aus Mehrfachkopien 30 verschiedener Proteine, den sogenannten Nukleoporinen (Nups), von denen die meisten unter Eukaryoten konserviert sind (39, 50, 173, 208).

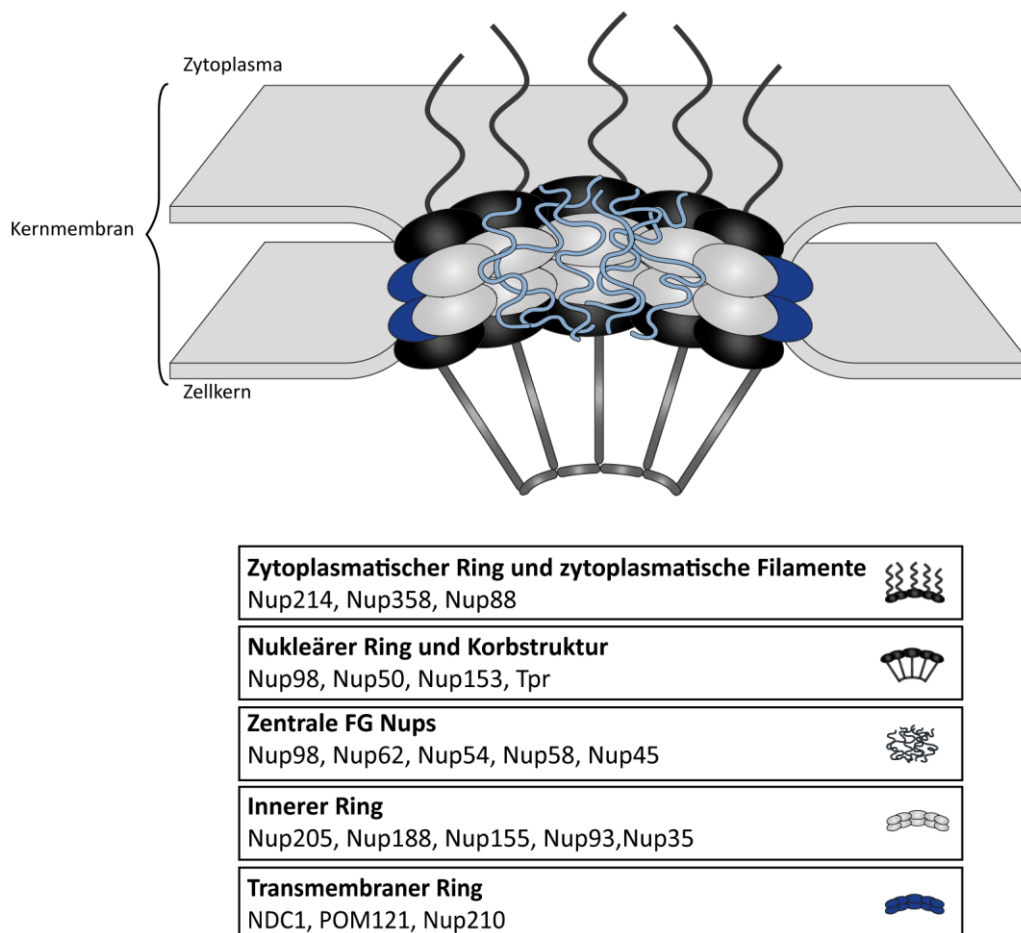


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Kernporenkomplexes. Der in der Kernhülle eingelagerte Kernporenkomplex besteht aus einem zytoplasmatischen Ring, einem inneren Ring und einem nukleären Ring. Über den inneren Transmembran-Ring ist der Kernporenkomplex in die Kernmembran verankert. Die zytoplasmatischen Filamente und die Korbstruktur dienen als Brücke zu den Zellvorgängen, wie z.B. mRNA Biogenese oder Proteintransport vom Zytoplasma in den Zellkern.

NPCs weisen eine achtfache Rotationssymmetrie auf, die zu einer Kopienzahl von acht, oder Vielfachen von acht, von jedem Nup pro *NPC* und insgesamt etwa 500 einzelnen Proteinen führt (62, 173).

Strukturell bestehen *NPCs* aus einem inneren Ring, der zwischen zwei Ringeinheiten, dem zytoplasmatischen und dem nukleären Ring, eingebettet ist. Diese Grundstruktur aus Ringen schafft einen zentralen Kanal mit einem minimalen Durchmesser von ca. 35 nm (50, 213). Vom zytoplasmatischen Ring ragen acht unregelmäßig geformte Filamente in das Zytoplasma, die zu transportierende Fracht in Richtung der Proteinsynthesemaschinerie leiten und gleichzeitig Proteine vom Zytoskelett in das Kerninnere lenken. Auf der nukleoplasmatischen Seite ragen ebenfalls acht Filamente vom nukleären Ring in das Kerninnere und vereinigen sich an ihrem distalen Ende zu der sog. Korbstruktur (im Folgenden als Korb bezeichnet). Der Korb verbindet den *NPC* mit Aspekten des nukleären Metabolismus, wie zum Beispiel der mRNA Biogenese und der Genomkonservierung (61, 96, 195, 208, 227).

3.4.1.1 Die Nukleopore

Die Nukleopore (Nups) können grob in drei Kategorien eingeordnet werden: Gerüst-Nups, die eine architektonische Rolle spielen, FG-Nups, die mit der Transportmaschinerie interagieren, und Transmembran-Nups, die den *NPC* in der Kernhülle verankern.

Gerüst-Nups bilden den zytoplasmatischen und den nukleären Ring und lassen sich in zwei Subkomplexe einteilen, den Y-Komplex und den inneren Ring. Der Y-Komplex besteht aus Nup96, Nup160, Nup133, Nup85, Nup107, SEC13 homologue 1 (SEH1) und Sec13 und setzen sich zu einer Y-förmigen Anordnung zusammen (195, 200). Der Komplex ist iso-stöchiometrisch, d.h. jedes Bauteil hat dieselbe Kopiennummer. Jeder *NPC* setzt sich aus 32 Y-Komplexen zusammen, wobei das grundlegende Strukturelement ein Dimer aus zwei rotationsverschobenen Y-Komplexen ist. Acht dieser Dimere bilden dann eine konzentrische Ringanordnung (27, 152). Der iso-stöchiometrische innere Ring besteht aus den Nups Nup205, Nup188, Nup155, Nup93 und Nup53 (226).

Die Transmembran-Nups GP210, NDC1, POM121 und TMEM33 verankern den Kernporenkomplex an die Kernhülle und spielen somit eine wichtige Rolle in der Entstehung und dem Zusammenbau des *NPC* (66, 180). Transmembran- und Gerüst-Nups sind symmetrisch auf beiden Seiten der Kernpore verteilt. Im Kerngerüst verankert sind sog. Kanal-Nukleopore, der Nup62-Komplex und Nup98. Bestandteile des Nup62-Komplexes und Nup98 sind sogenannte FG-Nups. Fast ein Drittel aller Nups sind FG-

Nups, und besitzen Phenylalanin-Glycin (FG)-reiche Domänen, die in den zentralen Kanal weisen und die Permeabilitätsbarriere bilden (47). Es gibt drei Arten von FG-Wiederholungen: FG-, GLFG-, oder FxFG. Diese Wiederholungen sind, neben dem FG-Motiv selbst, durch *Spacer*-Sequenzen von etwa 20, überwiegend polaren, Aminosäuren gekennzeichnet. FG-Nups spielen eine zentrale Rolle in Transportprozessen durch den NPC, da sie über ihre FG-Domänen mit nukleären Transport-Rezeptoren (engl: *nuclear export receptors*; NTR) interagieren (10, 168).

FG-Nups sind auch integrale oder verbindende Teile der zytoplasmatischen Filamente (Nup358, Nup214) und des Korbes (Nup153, Nup50). FG-Nups werden posttranslational durch die Anlagerung von monomeren Resten aus O-verknüpften *N*-Acetylglycosamin (O-GlnNAc) an Serinen oder Threoninen modifiziert (53, 74).

3.4.1.2 Nukleare Transportrezeptoren

Die größte Gruppe der nuklearen Transportrezeptoren (NTR) ist die Superfamilie der Importin- β -verwandten Proteine. Abhängig von der Richtung, in der sie ihre Fracht transportieren, werden sie als Importine (Imp; Zytoplasma \rightarrow Kern) oder Exportine (Exp; Kern \rightarrow Zytoplasma) bezeichnet. Importine und Exportine erkennen entweder direkt oder über Adapterproteine Transportsignale, wobei Importine Kernlokalisierungssignale (engl.: *nuclear localisation signal*, NLS) und Exportine Kernexportsignale (engl.: *nuclear export signal*, NES) erkennen. Mitglieder dieser Superfamilie sind unter anderem Imp- β , Crm-1 und CAS. Das Imp- β vermittelt den Transport von Proteinen, die eine klassische NLS besitzen. Die klassische NLS, charakterisiert durch einen oder mehrere Abschnitte basischer Aminosäuren, wird von dem Adapter-Imp- α erkannt, welches mit Imp- β interagiert. Das Crm-1, auch Exportin-1 oder Xpo-1 genannt, dient als Exportrezeptor für Proteine, die ein Leucin-reiches Exportsignal besitzen. Es benötigt allerdings Adapterproteine für den Exportvorgang. CAS ist ein spezialisiertes Exportin, das Imp- α exportiert.

Die zweite Gruppe an NTR besteht aus weniger Mitgliedern, wobei sie alle Ähnlichkeit mit dem Gründungsmitglied NTF2 haben, welches den Import von RanGDP in den Zellkern vermittelt.

3.4.2 Die Grundlagen des nukleozytoplasmatischen Transportes

Der NPC dient als hoch selektive Schleuse und erlaubt den Durchgang von Molekülen in zwei Modi: passive Diffusion für Moleküle die eine Größe von 20 bis 40 kDa nicht überschreiten (137), und aktive Translokation für Moleküle die größer als 40 kDa sind (62, 147). Ein einzelner NPC ermöglicht einen Massenfluss von fast 100 MDa/s und ca.

tausend aktiven Translokationen pro Sekunde (174). Der nukleozytoplasmatische Transport erfolgt schrittweise: Die Bindung des Frachtmoleküls an seinen spezifischen NTR, Andocken des NTR-Frachtkomplexes an den *NPC*, Translokation durch den *NPC*, und schließlich Freisetzung des Frachtmoleküls.

Wie in Kapitel 3.4.1.2 beschrieben, erkennen NTR spezifische Transportsignale und binden, entweder direkt oder indirekt, an ihr Frachtmolekül und transportieren dieses an den *NPC*. Die FG-Nups bilden eine selektive Permeabilitätsbarriere und dienen als Bindungsstellen für NTRs (40, 164, 220, 236). Es wurden mehrere Hypothesen aufgestellt und kontrovers diskutiert, wie FG-Nups organisiert sind und den Transport durch den *NPC* ermöglichen. Hierbei grenzen sich das „*virtual gating model*“ und das selektive Phasenmodell durch eine eindeutigere Datenlage ab. In beiden Modellen wird angenommen, dass die FG-Nups ein Netz bilden, wobei die biophysikalischen Eigenschaften die NTR-Fracht-Komplexe anziehen und somit die Passage durch die Kernpore ermöglichen und gleichzeitig andere Moleküle ausschließen.

Rout *et al.* schlugen das „*virtual gating*“ Modell vor, in dem der *NPC* als virtuelles Tor dient und die Bewegungen der FG-Nups nicht-spezifische Moleküle an der Passage durch den *NPC* hindern (181, 182). Das Modell geht davon aus, dass keine beachtliche Interaktion zwischen den FG-Motiven stattfindet, allerdings lenkt die Brown'sche Molekularbewegung dieser Motive große, inerte Moleküle aus dem Kanal ab, während kleine Moleküle diese Domänen ungehindert passieren können. Die NTRs können aufgrund ihrer Affinität zu den FG-Wiederholungen diese Barriere überwinden, da sich der Diffusionsgrad durch die Bindung verringert (186).

Das selektive Phasenmodell der Arbeitsgruppe Görlich beruht auf den Wechselwirkungen zwischen den FG-Motiven, die es ihnen ermöglicht, ein Sieb-ähnliches Netz als Permeabilitätsbarriere zu erzeugen (174, 175). Die FG-Nups bilden hochgeordnete Amyloidfibrillen, die zu einem Hydrogel aggregieren, welches Poren mit einem Durchmesser von unter 100 nm enthält. Die Maschengröße des Gels ermöglicht die freie Diffusion von kleinen Molekülen bis zu 30 kDa, und schließt größere Moleküle aus. Die Bindung der NTRs an den FG-Motiven führt zur Öffnung des Netzwerkes und ermöglicht die Passage durch den *NPC* (57).

Die GTPase Ran ist essenziell für die Direktionalität des Transportes. Sie existiert in GTP- und GDP-gebundener Form, wobei die GTP-gebundene Form im Kern und die GDP-gebundene Form im Zytoplasma vorliegt. Die Interaktion von NTRs mit RanGTP bestimmt in welchem Kompartiment ein NTR seine Fracht bindet oder freigibt. Im Zellkern erzwingt RanGTP das Auseinanderbauen des Imp-Cargo-Komplexes und bindet dann an Exp-Cargo Komplexe (4, 23, 63). Im Zytoplasma angekommen wird

RanGTP durch RanGAP zu RanGDP hydrolysiert (18, 19). Die Ran-bindenden Proteine RanBP1 und Nup358 fördern die initiale Dissoziation von Ran von den NTRs, damit RanGAP die Hydrolyse katalysieren kann (17, 104). Dies führt zur Freisetzung des Export-Cargo Komplexes (207). RanGDP wird dann durch seinen spezifischen NTR, den oben genannten NTF2, in den Zellkern zurückgeführt, wo RCC1 die Umwandlung von GDP zu GTP katalysiert (176).

Zusammenfassend benötigen Importine zur Bindung ihrer Fracht eine RanGTP-freie Umgebung, wie sie im Zytoplasma gegeben ist. Aufgrund der hohen Konzentration von RanGTP im Kern geben Importine dann ihre Fracht dort ab. Umgekehrt verlangen Exportine RanGTP, um ihre Fracht zu binden und geben diese in einer Umgebung frei, in der RanGTP zu RanGDP hydrolysiert wurde.

3.4.3 Der mRNA-Export

Verschiedene mRNAs variieren in ihrer Länge und besitzen keine gemeinsamen strukturellen Elemente außer der 5'-Cap (von englisch *cap*: Kappe) und dem Poly(A)-Schwanz. Dementsprechend sind diese Strukturen potenzielle Kandidaten als Signalgeber für die mRNA-Exportmaschinerie. So zeigt sich beim Injizieren von *in vitro* generierter mRNA in *Xenopus* Oozyten das Auftreten einer Cap-Struktur als auch die Anwesenheit eines Poly(A)-Schwanzes bei verbessertem Export. Untersuchungen zeigen jedoch, dass beides für einen Export nicht notwendig ist oder ausreichend sein kann (95). Allerdings konnte demonstriert werden, dass eine korrekte Bindung der 5'-Cap und die Polyadenylierung eine Voraussetzung für den erfolgreichen Export zellulärer mRNA ist. Eine weitere Voraussetzung für den Export ist die Bildung von *messenger*-Ribonukleotidpartikeln (mRNPs), die mehrere Proteine umfassen, die während der Transkription, des Spleißens und der 3'-End-Prozessierung auf die Transkripte übertragen werden, und das Andocken von mRNA-Exportrezeptoren ermöglichen.

Die Live-Verfolgung einzelner, mit Fluorophoren markierter mRNPs ermöglichte den Nachweis, dass der mRNA-Export in drei aufeinanderfolgende Schritte unterteilt werden kann: Das Andocken der mRNPs an die nukleoplasmatische Seite des NPCs, den Transport durch den Porenkanal und schließlich die Freisetzung an der zytoplasmatischen Seite (67, 199)

Die meisten mRNAs werden dabei durch den Exportrezeptor NXF1 exportiert, während ein bestimmter Anteil von mRNAs durch das Crm1 exportiert werden (55).

3.4.3.1 Der NXF1-NXT1-Komplex

Der NXF1-NXT1-Komplex ist der wichtigste mRNA-Exportrezeptor und interagiert mit den meisten FG-Nups, wobei diese Interaktion entscheidend für die Rekrutierung an den NPC, und somit für den mRNA Export ist (6, 103, 120).

Der Transkriptions-Export-Komplex (TREX) ist essenziell für den mRNA-Export. Er bindet an das 5'-Ende der Prä-mRNA, wobei dies abhängig vom Spleißen geschieht (32, 130, 171). Der TREX besteht aus dem THO-Komplex und einer Reihe von Exportfaktoren, darunter ALY und UAP56. Die ATP-gebundene Helikase UAP56 rekrutiert den Faktor ALY zum mRNP, wobei durch ATP-Hydrolyse der Transfer von ALY auf die mRNA stattfindet (209, 216). Anschließend bindet der NXF1-NXT1-Komplex an ALY, was dazu führt, dass der Exportrezeptor auf die mRNA übertragen wird. NXF1 besitzt eine RNA-Bindungsdomäne, allerdings liegt freies NXF1 in einer geschlossenen Formation vor, die nicht in der Lage ist, RNA effizient zu binden. Durch Bindung von TREX an NXF1 und der daraus resultierenden Konformationsänderung wird jedoch wieder ein effizientes Binden an mRNA ermöglicht (225). Die Bindung des Exportrezeptors ermöglicht nun das Andocken an den NPC. Um die Translokation und die gerichtete Freisetzung zu gewährleisten, muss sich die Konformation des mRNPs ändern. Dies wird nicht durch einen Ran-GTP-Gradienten vermittelt, sondern durch einen alternativen Mechanismus, der die Konformationsänderung (auch „*remodeling*“ genannt) des mRNPs erfordert. Hierzu wird die ATP-abhängige RNA Helikase Dbp5 benötigt (2, 222, 235), die über Nup214 an den zytoplasmatischen Filamenten des NPC lokalisiert ist (193). Die Helikase-Aktivität wird über die Nukleoporene Gle1, Nup214 und hCG1 stimuliert. Gle1 bindet an seinen Kofaktor Inositol Hexaphosphat (IP_6) und dockt an hCG1 (2, 105). Erreicht nun ein mRNP die zytoplasmatische Seite des NPCs, bindet es an Gle1 und Dbp5. IP_6 -gebundenes Gle1 stimuliert die ATPase-Aktivität von Dbp5 was zur Hydrolyse von ATP zu ADP führt (82, 150). Dies löst eine Konformationsänderung des mRNPs aus, was zum Ablösen einiger Proteine, unter anderem des Exportrezeptors, und letztlich zur Freisetzung in das Zytoplasma führt (125, 222, 229).

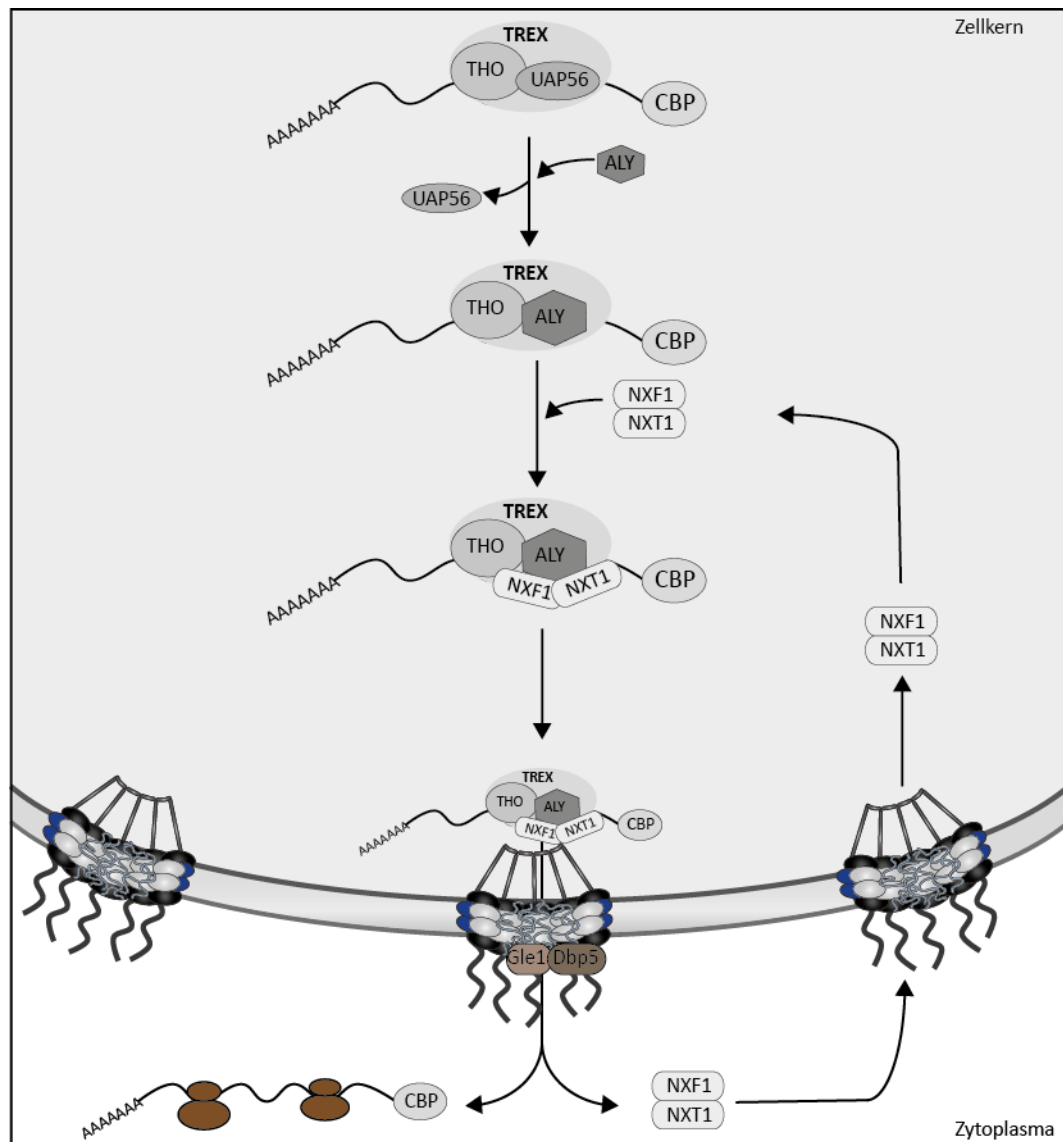


Abbildung 5: NXF1-NXT1-vermittelter mRNA-Export. Der 5'-gebundene TREX-Komplex besteht u.a. aus dem THO-Komplex und der Helikase UAP56, welche die Bindung des Exportfaktors ALY an die mRNA vermittelt. Der NXF1-NXT1 Exportrezeptor liegt im ungebundenen Zustand in einer geschlossenen Konformation vor, wobei die Bindung an ALY eine Konformationsänderung veranlasst und das effiziente Binden an mRNA gestattet. Die Bindung von NXF1-NXT1 an mRNA ermöglicht nun das Andocken an den NPC und den Transport in Richtung des Zytoplasmas wobei die Freisetzung in das Zytoplasma über Dbp5 und Gle1 vermittelt wird.

3.4.3.2 Das Crm1-Protein

Bestimmte Untergruppen von mRNAs werden in Abhängigkeit von Crm1 exportiert (55). Crm1 ist kein RNA-bindendes Protein, daher benötigt es ein Adapterprotein. Bisher wurden die Proteine HuR, LRPPRC und Nxf3 als Adapter identifiziert, allerdings gibt es auch viele von Crm1 exportierte RNAs, für die das Adapterprotein derzeit unbekannt ist (86). Das Crm1 interagiert mit FG-Nups und kann dadurch den NPC passieren. An Crm1 ist ebenfalls RanGTP gebunden, wobei die Crm1 gebundenen mRNAs durch die von RanGAP katalysierte Hydrolyse in das Zytoplasma freigesetzt werden können (wie bereits in Kapitel 3.4.2 beschrieben).

4 Ziele dieser Arbeit

Das Nichtstrukturprotein NSs des Riftalfieber Virus gilt als Hauptfaktor für dessen Virulenz. Es konnte bisher gezeigt werden, dass durch die Expression von NSs eine intrazelluläre Umgebung geschaffen wird, die eine Replikation des Virus begünstigt. Dies geschieht über drei unabhängige Mechanismen: zum einen fördert NSs den proteasomalen Abbau der PKR und zum anderen induziert NSs einen Transkriptionsblock. Zudem wird spezifisch die Induktion des Typ-I-Interferonsystems durch NSs inhibiert. Da eine Inaktivierung dieser NSs-Funktionen die Genexpression der Wirtszelle nicht vollständig wiederherstellt, wird in dieser Arbeit untersucht, ob das NSs weitere Mechanismen besitzt, um die Interferonantwort zu unterdrücken.

Daten aus einer Kollaboration mit Andreas Pichlmair und Guilio Superti-Furga zeigen, dass das NSs mit den mRNA-Exportfaktoren Nup98 und Rae1 interagiert, welche bekannte Ziele verschiedener Viren sind. So bindet z. B. das M-Protein des Vesicular stomatitis virus (VSV) an Rae1 und Nup98, um den Transport von mRNA aus dem Zellkern zu inhibieren. Demnach wird zunächst verifiziert, ob das NSs mit Nup98 und Rae1 interagiert und ob der Export der mRNA aus dem Zellkern durch NSs gestört wird. Da Nup98 nicht nur für den Transport von mRNAs sondern auch für Proteine involviert ist, wird zusätzlich bestimmt, ob RVFV NSs in den Proteintransport eingreift.

5 Material

5.1 Viren

Tabelle 1: Übersicht und Beschreibung verwendeter Viren.

Name	Virus	Beschreibung
rZH548	RVFV	Wildtyp-Isolat, "Zagazig hospital 548" (133), erzeugt durch ein cDNA-basiertes Rettungssystem (70).
Clone 13	RVFV	Attenuiertes RVFV Isolat. Enthält eine 69 % -ige Deletion in der NSs codierenden Region (146).
rZH-CF-NSs	RVFV	Rekombinanter ZH548 Stamm; NSs-Gen besitzt ein C-terminales FLAG-Tag (70).
rZHΔ-3xNF-ΔMx	RVFV	Rekombinanter ZH548 Stamm; NSs-Gen wurde durch 3xNF-ΔMx ersetzt (70).
LACV	LACV	Wildtyp-Isolat
rLACVdeINSs	LACV	Rekombinantes LACV, das aufgrund von mutierten Startcodons und eines eingefügten Stoppcodons innerhalb des NSs-Gens kein NSs-Protein exprimieren kann (21) .
RVFV-ΔNSs::Renilla	RVFV	Rekombinanter ZH548 Stamm; NSs-Gen wurde durch Renilla Luciferase ersetzt (113).
MP-12	RVFV	Zufällige Mutagenese des ZH548 Stammes mit 5'-fluorouracil für 12 aufeinanderfolgende Passagen (28).

5.2 Zellkultur von eukaryotischen Zellen

5.2.1 Eukaryotische Zellen

Tabelle 2: Übersicht über verwendete Zelllinien.

Bezeichnung	Organismus	Zelltyp
BHK (<i>baby hamster kidney</i>)	<i>Mesocricetus auratus</i> (Syrischer Goldhamster)	Fibroblasten
HEK-293	<i>Homo sapiens</i> (Mensch)	Embryonale Leberzellen
HeLa (Henrietta Lacks)	<i>Homo sapiens</i> (Mensch)	Zervikale Adenokarzinom-zellen
Huh7	<i>Homo sapiens</i> (Mensch)	Leberkrebszellen
NIH3T3	<i>Mus musculus</i> (Maus)	Fibroblasten
VeroE6	<i>Chlorocebus aethiops</i> (Äthiopische Grünmeerkatze)	Nierenepithelzellen

5.2.2 Reagenzien

Tabelle 3: Reagenzien für die Kultivierung eukaryotischer Zellen.

Name	Hersteller
0,05 % Trypsin-EDTA	Life Technologies
Avicel (3 % gelöst in H ₂ O)	FMC BioPolymer
DEAE-Dextran-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich
DMEM, high glucose, pyruvate, no glutamine	Life Technologies
Fetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i> , FCS)	Life Technologies
Lipofectamine RNAiMAX	Thermo Fisher
Opti-MEM, Reduced Serum Media	Life Technologies
Penicillin-Streptomycin-Glutamine (100X)	Gibco/ Thermo Scientific
TransIT-LT1	Mirus Bio LLC

5.2.3 Medien und Lösungen

Tabelle 4: Verwendete Medien und Lösungen für Zellkultur.

Bezeichnung	Inhalt	Konzentration/Menge
Zellkulturmedium		
DMEM versetzt mit:	FCS	10 %
	L-Glutamin, 200 mM	1 %
	Penicilin/Streptomycin, 5000 U/ml	1 %
Avicelmedium		
2x DMEM versetzt mit:	Avicel (3 %)	1,5 %
	DEAE-Dextran-Hydrochlorid	0,03 %
	FCS	10 %
	L-Glutamin, 200 mM	1 %
Kristallviolett-Lösung		
730 ml H ₂ O versetzt mit:	Formaldehyd	230 ml
	Kristallviolett	1 g

5.3 Zellkultur von prokaryotischen Zellen

5.3.1 Prokaryotische Zellen

Tabelle 5: Verwendete Bakterienstämme.

Bezeichnung	Organismus	Genotyp
DH10B	<i>Escherichia coli</i> (Bakterium)	F ⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80dlacZΔM15 ΔlacX74 endA1 recA1 deoR Δ(ara,leu)7697 araD139 galU galK nupG rpsL λ-
TOP10	<i>Escherichia coli</i> (Bakterium)	F ⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara leu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG

5.3.2 Medien und Lösungen

Tabelle 6: Medien und Lösungen für prokaryotische Zellen.

Bezeichnung	Inhalt	Konzentration/Menge
LB-Medium		
H ₂ O versetzt mit: (ad 5 l)	NaCl	50 g
	Hefeextrakt	25 g
	Pepton	50 g
LB-Agar		
LB-Medium versetzt mit:	Bacto-Agar	1,5 %
TBF-1-Lösung		
H ₂ O versetzt mit:	CaCl ₂	10 mM
	Glycerol	15 %
	Kaliumacetat	30 mM
	KCl	100 mM
	MnCl ₂	50 mM
TBF-2-Lösung		
H ₂ O versetzt mit:	CaCl ₂	75 mM
	Glycerol	15 %
	KCl	10 mM
	MOPS (3-(N-morpho- lino)propanesulfonic acid)	10 mM

5.4 Antikörper

Tabelle 7: Verwendete Antikörper für Western Blots.

Protein	Spezies	Klonalität	Verdünnung	Hersteller	# ¹
Primärantikörper					
Flag TM	Kaninchen	Polyklonal	1:3200	Sigma	9
HA	Kaninchen	Polyklonal	1:1000	Abcam	11
β-tubulin	Kaninchen	Polyklonal	1:1000	Abcam	12
Nup153	Kaninchen	Polyklonal	1:1000	Sigma	271
Nup214	Kaninchen	Polyklonal	1:10000	Abcam	273
PABP	Kaninchen	Polyklonal	1:1000	Abcam	268
RanBP2	Kaninchen	Polyklonal	1:1000	Abcam	298
Thoc2	Kaninchen	Polyklonal	1:200	Sigma	250
DDX19	Kaninchen	Polyklonal	1:1000	Abcam	354
Exportin-1	Maus	Polyklonal	1:1000	BD Transduction Laboratories	348
GTF2H1	Maus	Monoklonal	1:500	Abcam	107
LACV N	Kaninchen	Polyclonal	1:5000	G. Kochs, Freiburg	25
Lamin A/C	Maus	Monoclonal	1:1000	Santa Cruz	266
Lamin B1 (C-5)	Maus	Monoklonal	1:1000	Santa Cruz	269
Nup62	Maus	Monoklonal	1:4000	BD Transduction Laboratories	232
Nup88	Maus	Polyklonal	1:1000	BD Transduction Laboratories	349
Nup98	Kaninchen	Monoklonal	1:1000	Abcam	194
Nup98 (C39A3)	Kaninchen	Polyklonal	1:1000	Cell Signalling	267
NXF1	Kaninchen	Monoklonal	1:1000	Abcam	356

¹ Laborinterne Referenznummer

Rae1	Ziege	Polyklonal	1:500	Thermo Scientific	175
RVFV N	Kaninchen	Polyclonal	1:2000	Alejandro Brun	130
β-Actin	Maus	Monoklonal	1:1000	Cell Signaling	53
UAP56	Kaninchen	Polyklonal	1:500	Santa Cruz	275
NXF1	Maus	Monoklonal	1:1000	abcam	387
ALY	Kaninchen	Monoklonal	1:1000	abcam	371
Nup358	Maus	Monoklonal	1:1000	Santa Cruz	384
DDX39	Kaninchen	Polyklonal	1:2000	OriGene	346
Sekundärantikörper					
Peroxidase-conjugated Goat anti-Mouse IgG	Ziege	Polyklonal	1:20000	Thermo Fisher	3
Peroxidase-conjugated Goat anti-Rabbit IgG	Ziege	Polyklonal	1:20000	Thermo Fisher	4
Anti-goat IgG-HRP	Esel	Polyklonal	1:10000	Santa Cruz	72

Tabelle 8: Übersicht über verwendete Antikörper für Immunfluoreszenz-Analysen.

Protein	Spezies	Klonalität	Verdünnung	Hersteller	# ¹
Primärantikörper					
Flag TM	Kaninchen	Polyklonal	1:3200	Sigma –Aldrich	9
HA	Kaninchen	Polyklonal	1:1000	Abcam	11
Nup153	Kaninchen	Polyklonal	1:1000	Sigma	271
Nup214	Kaninchen	Polyklonal	1:1000	Abcam	273
PABP	Kaninchen	Polyklonal	1:500	Abcam	268

¹ Laborinterne Referenznummer

RanBP2	Maus	Monoklonal	1:100	Santa Cruz	384
Thoc2	Kaninchen	Polyklonal	1:200	Sigma	250
DDX19	Kaninchen	Polyklonal	1:1000	Abcam	354
LACV N	Kaninchen	Polyclonal	1:5000	G. Kochs, Freiburg	25
Lamin A/C	Maus	Monoklonal	1:1000	Santa Cruz	266
Lamin B1 (C-5)	Maus	Monoklonal	1:1000	Santa Cruz	269
Nup62	Maus	Monoklonal	1:2000	BD Transduction Laboratories	232
Nup88	Maus	Polyklonal	1:1000	BD Transduction Laboratories	349
Nup98 (C39A3)	Kaninchen	Polyklonal	1:1000	Cell Signalling	267
NXF1	Maus	Monoklonal	1:200	Abcam	387
Rae1	Ziege	Polyklonal	1:200	Thermo Scientific	175
RVFV N	Kaninchen	Polyclonal	1:2000	Alejandro Brun	130
RVFV N	Maus	Polyklonal	1:800	Alejandro Brun	129
UAP56	Kaninchen	Polyklonal	1:200	Santa Cruz	275
DDX39	Kaninchen	Polyklonal	1:200	OriGene	346
ALY	Kaninchen	Monoklonal	1:100	Abcam	371
Anti-NPC	Maus	Monoklonal	1:2000	Covance	272
Sekundärantikörper					
Alexa Fluor 488 Donkey anti-goat IgG	Esel	Polyklonal	1:200	Thermo Scientific	78
Alexa Fluor 488 Donkey anti-mouse IgG	Esel	Polyklonal	1:200	Thermo Scientific	6

Alexa Fluor 488 Donkey anti-rabbit IgG	Esel	Polyklonal	1:200	Thermo Scientific	77
Alexa Fluor 488 Donkey anti-rat IgG	Esel	Polyklonal	1:200	Thermo Scientific	143
Alexa Fluor 555 Donkey anti-mouse IgG	Esel	Polyklonal	1:200	Thermo Scientific	7
Alexa Fluor 647 Donkey anti-rabbit IgG	Esel	Polyklonal	1:200	Thermo Scientific	214
Alexa Fluor 647 Goat Anti-Mouse IgG	Esel	Polyklonal	1:200	Thermo Scientific	177

5.5 Oligonukleotide

5.5.1 Primer für quantitative Realtime-PCR

Tabelle 9: Übersicht über verwendete Primer für qRT-PCR.

Genname	Sequenz oder Produktnummer	Hersteller	# ¹
Primer für humane Zielgene			
18S ribosomale RNA (Hs_RRN18S_1_SG)	QT00199367	Qiagen	36

¹ Laborinterne Referenznummer

GAPDH (Hs_GAPDH_2_SG)	QT01192646	Qiagen	37
IFN- β (Hs_IFNB1_1_SG)	QT00203763	Qiagen	18
Nup214 (Hs_Nup214_1_SG)	QT00064302	Qiagen	62
Nup98 (Hs_NUP98_1_SG)	QT00085372	Qiagen	57
Rae1 (Hs_RAE1_1_SG)	QT00044282	Qiagen	27
Nup62 (HS_NUP62_1_SG)	QT00064414	Qiagen	64
NXF1 (HS_NXF1_1SG)	QT00096474	Qiagen	115
Primer für virale Zielgene			
RVFL-2912fwdGG	TGAAAATTCCTGAGACACATGG (16)		168
RVFL-2981revAC	ACTTCCTTGCATCATCTGATG (16)		169
RVFL-probe-2950	6-FAM- CAATGTAAGGGGCCTGTGTGGAC TTGTG-BHQ1		179

5.5.2 Primer für Sequenzierungen

Tabelle 10: Übersicht über verwendete Sequenzierprimer.

Genname	Sequenz oder Produktnummer	# ¹
3'XhoI-ZH548_N	GACACTCGAGTTAGGCTGCTGTCTTGTAAGCCTGA	44
5'Esp3I-ZH548_N	GACAGACGTCTCACATGGACAACATCAAGAGCTT GCGAT	97
BGH-R-seq-primer	TAGAAGGCACAGTCGAGG	36

¹ Laborinterne Referenznummer

GPO3	GGGAGCAAACACGATAGATACCCT	437
HHcS-ZHPro4rev	TCTGTCGCCGGCCACACAAAGACCCCCTAGTGCT	78
LACV_N_ORF_fw	GACAGCTAGCATGTCTGGATTTGGTGTTTT	148
LACV_N_ORF_rev	GACAGCGGCCGCTTATGGAAGCCTGATGCCAAAT TTCTG	149
MGSO	TGCACCATCTGTCACTCTGTTAACCTC	438
NSs diagnostic RV	GGTGGGGCAGCCTTAACC	183
T7-seq-primer	TAATACGACTCACTATAGGG	35

5.5.3 Small interfering RNA (siRNA)

Tabelle 11: Übersicht über siRNA für *knock-down* Experimente.

Name	Ziel	Hersteller	Produktnummer
All Star negative control	-	Qiagen	1027280
Hs_Nup98_3	Nup98	Qiagen	SI00115332
Hs_Nup98_5	Nup98	Qiagen	SI02635115
Hs_Nup98_7	Nup98	Qiagen	SI03028578
Hs_Nup98_8	Nup98	Qiagen	SI03088491
Hs_RAE1_10	Rae1	Qiagen	SI04358676
Hs_RAE1_5	Rae1	Qiagen	SI03170258
Hs_RAE1_8	Rae1	Qiagen	SI03245466
Hs_RAE1_9	Rae1	Qiagen	SI04283356
Hs_Nup214_7	Nup214	Qiagen	SI04329521
Hs_Nup214_6	Nup214	Qiagen	SI04290888
Hs_Nup214_5	Nup214	Qiagen	SI04200056
Hs_Nup214_4	Nup214	Qiagen	SI00663124
Hs_Nup62_2	Nup62	Qiagen	SI00116746
Hs_Nup62_3	Nup62	Qiagen	SI00116753

Hs_Nup62_5	Nup62	Qiagen	SI02642381
Hs_Nup62_6	Nup62	Qiagen	SI03021102
Hs_NXF1_2	NXF1	Qiagen	SI04307492
Hs_NXF1_4	NXF1	Qiagen	SI04184033
Hs_NXF1_5	NXF1	Qiagen	SI00663516
Hs_NXF1_6	NXF1	Qiagen	SI00663502

5.6 DNA-Plasmide

Tabelle 12: Übersicht über verwendete DNA-Plasmide.

Bezeichnung	Resistenz	Beschreibung	# ¹
pcDNA3.1 3xHA-ΔMx	Ampicillin	Kodiert ΔMx ORF nach einem 3xHA-Tag.	401
pcDNA3.1_3xHA-Nup98	Ampicillin	Kodiert für humanes Nup98 mit einem 3xHA-Tag (N-terminal).	690
pcDNA3.1-3xHA-FBXW11/1	Ampicillin	Kodiert für humanes FBXW11 (Isoform 1) mit einem N-terminalem 3xHA-Tag.	610
pcDNA3.2-Rae1-3xHA	Ampicillin	Kodiert für humanes Rae1 mit einem N-terminalen 3xHA-Tag.	560
pEGFP-M9	Kanamycin	Kodiert für GFP mit einem M9-Lokalisierungssignal	925
pEGFP-N1	Kanamycin	EGFP Fusionsvektor	46
pEGFP-N1-NSsRVFV	Kanamycin	Kodiert für RVFV NSs mit einem C-terminalen GFP	887
pEGFP-NLS	Kanamycin	Kodiert für GFP mit einem SV40 Kernlokalisierungssignal	926
pl.18 3xFLAG-LACV_NSs	Ampicillin	Kodiert LACV NSs mit einem C-terminalen 3xFLAG-Tag	217

¹ Laborinterne Referenznummer

pl.18 3xFLAG-ΔMx	Ampicillin	Kodiert ΔMx ORF nach einem 3xFLAG-Tag.	219
pl.18-3XFLAG NSs TOSV	Ampicillin	Kodiert TOSV NSs mit einem C-terminalen 3xFLAG-Tag	937
pl.18-3XFLAG-NSsPTV-A	Ampicillin	Kodiert PTV-A NSs mit einem C-terminalen 3xFLAG-Tag	913
pl.18-3XFLAG-NSsPTV-B	Ampicillin	Kodiert PTV-B NSs mit einem C-terminalen 3xFLAG-Tag	914
pl.18-3XFLAG-NSsSFSV	Ampicillin	Kodiert SFSV NSs mit einem C-terminalen 3xFLAG-Tag	912
pl.18-NSs-3xFLAG	Ampicillin	Kodiert RVFV NSs mit einem C-terminalen 3xFLAG-Tag.	556

5.7 Enzyme und Längenstandards

Tabelle 13: Übersicht über Enzyme und Längenstandards.

Bezeichnung	Hersteller
ColorPlus Prestained Protein Ladder	NEB
DNaseI	Qiagen
EcoRI	Fermentas
GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific
HiMark Pre-stained protein standard	Thermo Fisher Scientific
JumpStart™ Taq DNA Polymerase	Sigma
KOD Hot Start DNA Polymerase	Calbiochem
XhoI	Fermentas

5.8 Kits

Tabelle 14: Übersicht über verwendete Kits.

Produktbezeichnung	Hersteller
DNA- und RNA-Isolation	
Plasmid Midi Kit	Omega bio-tek
Plasmid Mini Kit I	Omega bio-tek
QIAamp Viral RNA Mini Kit	QIAamp Viral RNA Mini Kit
RNeasy Mini Kit	Qiagen
RT-PCR und qRT-PCR Kits	
OneStep RT-PCR Kit	Qiagen
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen
QuantiTect SYBR Green PCR Kit	Qiagen
QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit	Qiagen
SensiMix II Probe Kit	Bioline
Western Blot	
SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Fisher Scientific
SuperSignal West Pico Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Fisher Scientific
Sonstige	
Dual Luciferase Reporter System	Promega

5.9 Puffer und Lösungen

Tabelle 15: In dieser Arbeit verwendete Puffer und Lösungen.

Bezeichnung	Zusammensetzung	Konzentration/Menge
Probenpuffer		
5x SDS-Probenpuffer	Tris-HCl pH 6,8	250 mM
	SDS	10 %

	Glycerin	50 %
	β -Mercaptoethanol	25 %
	Bromphenolblau	0,5 %
SDS-PAGE und Western Blot		
10 % APS in H ₂ O	APS	10 %
10 % SDS in H ₂ O	SDS	10 %
Trenngelpuffer (pH 8,8)	Tris-HCl	1,5 M
Sammelgelpuffer (pH 6,8)	Tris-HCl	0,5 M
SDS-Laufpuffer	Glycin	384 mM
	SDS	0,1 %
	Tris	50 mM
10x TBS (pH 7,6)	NaCl	1,37 M
	Tris	200 mM
<i>Semidry</i> -Transferpuffer	Glycin	39 mM
	Methanol	20 %
	SDS	1,3 mM
	Tris	48 mM
Towbin-Puffer	Glycin	192 mM
	Methanol	20 %
	Tris	25 mM
Immunfluoreszenz		
Fixierlösung (in PBS _{def})	PFA	4 %
Permeabilisierungspuffer (in PBS _{def})	Triton X-100	0,5 %
Blockpuffer (in PBS _{def})	FCS	1 %
20x SSC Puffer	NaCl	3 M
	Trinatriumcitrat	0,3 M
Hybridisierungslösung	t-RNA	1 mg/ml

	Dextransulfat	10 % (w/v)
	Formamid	25 %
	SSC	2x
	Oligo(dT) Sonde	50 µg/ml
Prä-Hybridisierungslösung	t-RNA	1 mg/ml
	Dextransulfat	10 % (w/v)
	Formamid	25 %
	SSC	2x
Kern-Zytoplasma Fraktionierung		
0,1% NP-40 in PBS _{def}	NP-40	0,1 %
RIPA	Tris-HCl	50 mM
	NaCl	0,15 M
	NP-40	1 %
Sonstige		
PBS _{def} (ad 1 l H ₂ O)	KCl	0,2 g
	KH ₂ HPO ₄	0,2 g
	NaCl	8 g
	Na ₂ HPO ₄	1,15 g

5.10 Chemikalien, Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 16: Chemikalien, Reagenzien und Verbrauchsmaterialien.

Bezeichnung	Hersteller
Chemikalien und Reagenzien	
Acrylamid	Roth
Actinomycin D	Sigma-Aldrich
Agar	Merck
Agarose	SERVA

Ampicillin sodium salt (50 mg/ml)	Sigma-Aldrich
Chromatographiepapier	Albert LabScience
Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche
Cycloheximide	Sigma-Aldrich
DRAQ5	eBioscience / Biostatus
Ethanol absolut	Roth
Ethanol vergällt	Roth
Ethidiumbromid	Promega
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth
FluorSave Reagent	Merck
Glycerin	Roth
Glycin	Roth
Hefeextrakt	Merck
Isopropanol	Sigma-Aldrich
Kaliumacetat	Merck
Kaliumchlorid	Merck
Kanamycinsulfat	Merck
Kristallviolett	Sigma-Aldrich
Magnesiumchlorid	NEB
Mangan(II)-chlorid	NEB
Methanol	Roth
Milchpulver	Saliter
N,N,N',N'-Tetramethylethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich
NaOH	Sigma-Alrich
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich

Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i> , SDS)	Merck
NP-40	Sigma
Paraformaldehyd	Roth
Pepton	Merck
Polyethylenglycol	Roche
Salzsäure	Merck
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
TEMED	Sigma-Aldrich
T-Per Tissue Protein Extraction Reagent	Thermo Fisher
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Acros Organics
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Trypsin (L-1-Tosylamido-2-Phenylethyl-Chloromethyl-Keton-behandelt)	Sigma-Aldrich
Tween-20	Sigma-Aldrich
Z-Val-Ala-DL-Asp(OMe)fluoromethylketon	Bachem
α -Amanitin	AppliChem
Verbrauchsmaterialien	
Chromatographiepapier	Kobe
Deckgläser, 12 mm Durchmesser	L. Langenbrinck
Deckgläser, 18 mm Durchmesser	Thermo Scientific
FFP3-Masken	3 M
Kryoröhrchen	Sarstedt
MicroAmp 96-Well Optical Adhesive Films	Life Technologies
MicroAmp 96-Well Reaction Plate	Life Technologies
Mikroschraub Röhrchen	Sarstedt
Objektträger mit Mattrand, geschnitten	Roth
Parafilm	Pechiney Plastic

PCR-Reaktionsgefäße, 0,2 ml	Biozym
Petrischalen	Sarstedt
Pipettenspitzen, Tip-One, 0,1 – 1000 µl	Starlab
Polypropylen-Reaktionsgefäße (Falcon), 15 – 50 ml	Sarstedt
Reaktionsgefäße, 1,5 ml	Sarstedt
Reaktionsgefäße, 2 ml	Eppendorf
Zählkammer Neubauer, 0,0025 mm ²	Marienfeld
Zellkulturflaschen, 75 – 175 cm ²	Greiner Bio-One
Zellkulturplatten, 6-, 12-, 24-, und 96-Well	Greiner Bio-One
Zellschaber	Roth

5.11 Geräte und Software

Tabelle 17: Geräte und Software.

Bezeichnung	Hersteller
Allegra® X-15R Centrifuge	Beckman Coulter
ChemiDoc XRS+	Bio-Rad
Criterion Blotter	Bio-Rad
Digi-Block JR Heizblock	Laboratory Devices Inc.
DNA-Gelkammer	Bio-Rad
Evos® XL Core Imaging System	Life technologies
Feinwaage	Sartorius
GFL Schüttler Series 3018	GFL
Handy Step electronic	Brand
HeraCell 240 Inkubator	Thermo Fisher
HeraSAFE Biologische Sicherheitswerkbank	Thermo Fisher
Laser Scanning Inverted Confocal Microscope TCS SP5 II	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH

Magnetrührer MR 2000	Heidolph
Microfuge20 Centrifuge	Beckman Coulter
Mini Trans-Blot Cell	Bio-Rad
NanoDrop Spektrophotometer ND-1000	PeqLab
Reagenzglasmixer Vortex	Heidolph
Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad
Transmissionselektronenmikroskop EM912a/b	Zeiss
TriStar2 Multimode LB942	Berthold
Ultraschallbad	Branson
UV-Schirm, 302 nm	Bachofer
Wasserbad	Köttermann
Software	
Adobe Illustrator	Adobe
Bio-Rad Image Lab	Bio-Rad
GraphPad PRISM	GraphPad Software, Inc.
ImageJ	NIH
Leica LAS AF	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH
Mendeley Reference Manager	Mendeley
Microsoft Office Word, Excel, PowerPoint 2016	Microsoft
StepOne Software v2.1	Applied Biosystems

6 Methoden

6.1 Virologische Methoden

6.1.1 Virusproduktion

Für die Virusproduktion werden in einer 175 cm²-Flasche 30 % konfluente Vero E6-Zellen mit einer MOI (engl.: *multiplicity of infection*) von 0,001 infiziert, wobei die Viren in 5 ml Infektionsmedium aufgenommen werden. Hierfür wird zuerst das Zellkulturmedium von den Zellen abgesaugt, der Zellrasen mit PBS_{def} gewaschen und dann das Infektionsmedium hinzugegeben. Das Infektionsmedium verbleibt für 60 min auf den Zellen, hierbei wird die Flasche alle 10 min leicht geschwenkt. Die Inkubation erfolgt im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit. Nach der spezifischen Inkubationsdauer werden 15 ml Zellkulturmedium zu dem Inokulum gegeben und die infizierten Zellen werden für drei weitere Tage im Inkubator inkubiert. Nach dieser Zeit kann mit Hilfe eines Lichtmikroskops der zytopathische Effekt (engl.: *cytopathic effect*, CPE) beobachtet werden. Die Kulturüberstände werden in einem 50 ml Reaktionsgefäß gesammelt und für 5 min bei einer Drehzahl von 1000 U / min zentrifugiert. Der nun zellfreie Überstand wird in Kryoröhrchen aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Anschließend erfolgt die Titerbestimmung (siehe 6.1.2) und die Virusverifizierung (siehe Kapitel 6.1.4).

6.1.2 Titerbestimmung mittels Plaque-Assay

Mittels Plaque-Assays wird die Zahl der Plaque-bildenden Einheiten (engl.: *plaque forming units*, PFU) pro ml Virusprobe bestimmt. Nach der Infektion einer Zelle kommt es zur Lyse der Zellen, wobei freigesetzte Viruspartikel benachbarte Zellen infizieren können. Passiert dies in einem konfluenten Zellrasen, wird dies durch die Bildung eines Lysishofes sichtbar.

Vero E6-Zellen werden in einer 12-Well-Platte so ausgesät, dass sie am Tag der Infektion 90 % konfluent sind. Für die Titerbestimmung wird eine Verdünnungsreihe mit relativen Konzentrationen von 10⁻² bis 10⁻⁶ des Virus hergestellt. Nach dem Absaugen des Zellkulturmediums werden die Zellen mit PBS_{def} gewaschen und mit 100 µl der Virusverdünnung versehen. Nach einer einstündigen Infektion wird das Inokulum entfernt und 1 ml Avicelmedium zu den Zellen gegeben. Dies verhindert, dass sich die Virusinfektion über das Medium verbreitet. Nach drei Tagen wird dann das Avicelmedium abgesaugt und die Zellen so lange mit PBS_{def} gewaschen, bis das Avicelmedium

rückstandslos entfernt ist. Anschließend wird 1 ml Kristallviolett-Lösung auf die Zellen gegeben und diese dann für 20 min inkubiert. Die Kristallviolett-Lösung wird dann abgesaugt und die Zellen so lange mit PBS_{def} gewaschen, bis die Plaques sichtbar sind. Anhand der ausgezählten Plaques kann nun der Titer über die Formel

$$\frac{\text{PFU}}{\text{ml}} = \text{Anzahl der Plaques} \times 10 \times \frac{1}{\text{Verdünnungsfaktor}}$$

errechnet werden.

6.1.3 Immunofocus assay für Titerbestimmung

Für eine große Probenanzahl wird statt des oben beschriebenen Plaque-Assays der Immunofocus-Assay angewendet. Hier werden BHK-Zellen in einer 96-Well-Platte so ausgesät, dass sie am Tag der Infektion 90 % konfluent sind. Bei dieser Methode wird ebenfalls eine Verdünnungsreihe mit relativen Konzentrationen von 10^{-2} bis 10^{-6} angefertigt, wobei nur 40 µl als Inokulum verwendet werden. Nach einer einstündigen Inkubation wird das Inokulum abgesaugt und das Avicelmedium zu den Zellen gegeben. Nach 24 h wird das Avicelmedium abgesaugt und die Zellen so lange mit PBS_{def} gewaschen, bis das Avicel komplett entfernt ist. Anschließend erfolgt eine Fixierung mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) für 24 h. Nach der Fixierung wird das PFA mit PBS_{def} abgewaschen und die Zellen mit drei Waschungen mit 0,1 % Triton X-100 in PBS_{def} permeabilisiert. Anschließend erfolgt die Absättigung mit 5 % Trockenmilch in 0,1 % Tween-20 in TBS (TBS-T) für 60 min. Nach der Inkubationszeit erfolgt die Behandlung mit einem polyklonalem Antiserum (siehe Tabelle 7) für 60 min. Ungebundenes Antiserum wird durch drei Waschungen mit 5 % Milchpulver in TBS-T entfernt. Dann erfolgt die einstündige Inkubation mit dem IRDye800-gekoppelten sekundären Antikörper und 0,5 µM DRAQ 5 für die Visualisierung des Zellrasens. Überschüssige Antikörper werden durch dreimaliges Waschen mit TBS-T entfernt. Die Bildgebung erfolgt mit dem ChemiDoc XRS+. Da dieser Assay keine Plaques detektiert, sondern immungefärbte Herde wird der Titer in fokusbildenden Einheiten (engl.: *focus forming units*, FFU) pro ml angegeben. Anhand der ausgezählten Foci kann nun der Titer über die Formel

$$\frac{\text{FFU}}{\text{ml}} = \text{Anzahl der Foci} \times 25 \times \frac{1}{\text{Verdünnungsfaktor}}$$

errechnet werden.

6.1.4 Virusverifizierung

Zur Virusverifizierung wird eine RT-PCR-Analyse mit anschließender Sequenzierung verwendet. Dazu wird aus dem aliquotierten Virus (siehe Kapitel 6.1.1) mit dem „Viral RNA Mini Kit“ der Firma Qiagen RNA isoliert und eine DNaseI-Behandlung durchgeführt. Mit spezifischen Primern (siehe Tabelle 5.5.2) wird dann die reverse Transkription und PCR-Amplifikation der N- und NSs Loci, unter Verwendung des „OneStep RT-PCR Kits“ der Firma Qiagen durchgeführt. Ein Teil des resultierenden PCR-Produktes wird dann auf ein 1 %-iges Agarosegel aufgetragen und für 45 min bei einer Potentialdifferenz von 100 V elektrophoretisch aufgetrennt. Nach der Inkubation mit Ethidiumbromid kann das Gel bei UV-Licht analysiert werden und die Größe der PCR Produkte mit den theoretischen Werten verglichen werden. Um Mutationen auszuschließen wird das PCR-Produkt ebenfalls sequenziert.

6.1.5 Infektion eukaryotischer Zellen

Einen Tag vor der Infektion wird die benötigte Zellzahl in Zellkulturflaschen oder Zellkulturplatten ausgesät. Anhand der ausgesäten Zellen und der gewünschten MOI kann das benötigte Volumen des Virus berechnet werden. Hierfür wird folgende Formel verwendet:

$$\frac{\text{Anzahl der Zellen}}{\text{Virustiter} \left[\frac{\text{PFU}}{\text{ml}} \right]} = \text{MOI} \quad 1 \times \text{gewünschte MOI} \times 1000 = x \text{ } [\mu\text{l}]$$

Für die Infektion wird das Zellkulturmedium abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS_{def} gewaschen. Anschließend wird das Virus in Infektionsmedium auf die Zellen pipettiert. Danach erfolgt eine Inkubation im Brutschrank für 1 h, wobei die Zellen alle 10 min geschwenkt werden. Nachfolgend wird das Inokulum abgesaugt, frisches Zellkulturmedium zu den Zellen gegeben und diese wieder in den Inkubator gegeben. Nach der gewünschten Infektionszeit können die Zellen für weitere Analysen bearbeitet werden.

6.1.6 Arbeiten in BSL-3

Um Proben aus dem BSL-3 Labor in einem S2-Laborumfeld zu handhaben, wird eine Inaktivierung der Proben nach der aktuellen Standardarbeitsanweisung (engl.: *Standard Operating Procedure*, SOP) der BSL-3 Einrichtung des Instituts für Virologie, Philipps-Universität Marburg, durchgeführt.

Für Immunfluoreszenzanalysen benötigte Proben werden mit PBS_{def} gewaschen und innerhalb des BSL-3 Labors mit 4 % PFA in PBS_{def} für mindestens 16 Stunden bei +4 °C

fixiert. Die Deckgläser werden dann in ein neues Gefäß mit neuer 4 %-iger PFA-Lösung gegeben, aus dem BSL-3 Labor ausgeschleust und über Nacht bei +4 °C inkubiert. Die Färbung der Deckgläser kann nun, wie in Kapitel 6.6 beschrieben, durchgeführt werden.

Um Proben für Western-Blot-Analysen zu erhalten, müssen die Zellen in Gegenwart von 1 % SDS lysiert und für 10 min aufgekocht werden. Die Proben werden dann in ein neues Reaktionsgefäß überführt und können dann aus der BSL-3 Anlage ausgeschleust werden. Bevor mit dem Western-Blot begonnen werden kann (siehe Kapitel 6.5), müssen die Proben nochmals für 10 min aufgekocht werden.

Für RNA-Isolationen aus Zellen wird das „RNeasy Mini Kit“ (Qiagen) verwendet und die Isolation von RNA aus Virusproben erfolgt mittels „QIAamp Viral RNA Mini Kit“. Bei beiden Kits werden die Proben mit einem Volumen Lysepuffer, welcher Guanidin-Isothiocyanat zur Inaktivierung beinhaltet, lysiert und homogenisiert und bei Raumtemperatur für 15 min inkubiert. Zum Abschluss wird ein Volumen 70 % Ethanol zu den Proben hinzugefügt und der gesamte Ansatz in ein sauberes Reaktionsgefäß überführt. Im Anschluss können diese Proben ausgeschleust und gemäß dem Protokoll der Hersteller weiter prozessiert werden.

6.2 Zellkultur eukaryotischer Zellen

6.2.1 Kultivieren von eukaryotischen Zellen

Die verwendeten Zelllinien wurden in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) kultiviert welches 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin, 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin enthält. Die Zellen werden in 75 cm²-Zellkulturflaschen unter Standardbedingungen im Inkubator bei 37 °C, 5 % CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit gelagert. Die Passage der Zelllinien wird alle drei bis vier Tage durchgeführt. Hierzu wird das Zellkulturmedium von dem konfluenten Zellrasen abgesaugt, mit vorgewärmten sterilen PBS_{def} gewaschen und durch Zugabe von 2 ml 0,05-%igem Trypsin-EDTA vom Flaschenboden im Inkubator abgelöst. Zum Stoppen der Reaktion des Trypsins werden die Zellen in 8 ml Zellkulturmedium resuspendiert und in der gewünschten Verdünnung oder Zellzahl in eine neue Zellkulturflasche oder -platte ausgesät.

6.2.2 Transiente Transfektion von eukaryotischen Zellen

6.2.2.1 Plasmid-DNA

Für das Einbringen von Plasmid-DNA in eukaryotische Zellen wurde das TransIT™-LT1 Transfektionsreagenz der Firma Mirus Bio LLC verwendet.

In Abhängigkeit des Versuchsansatzes werden die Zellen normal oder revers transfiziert. Bei der normalen Transfektion werden die Zellen so ausgesät, dass sie am Tag der Transfektion die gewünschte Zelldichte erreichen. Dagegen wird bei einer reversen Transfektion erst das Transfektionsreagenz in die Vertiefung einer Zellkulturplatte vorgelegt und anschließend werden die Zellen in der gewünschten Konzentration hinzugegeben.

Für einen einzelnen Transfektionsansatz werden in einem Reaktionsgefäß 0,5 µg DNA mit 50 µl Opti-Mem gemischt. Zu der DNA-Verdünnung werden dann 1,5 µl TransIT gegeben und durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 15 min wird der Reaktionsansatz tröpfchenweise auf die ausgesäten Zellen (normale Transfektion) oder direkt in eine Vertiefung einer 24-Well-Zellkulturplatte gegeben (reverse Transfektion). Nach 24 h Inkubationszeit im Brutschrank werden die Zellen entweder für die weitere Analyse lysiert oder infiziert.

6.2.2.2 Transfektion von siRNA

Zur Generierung von *knock-down*-Zellen werden HeLa Zellen revers mit den entsprechenden siRNAs transfiziert. Für alle *knock-down*-Ansätze wird ein Pool aus siRNAs gewählt, wobei als Kontrolle die AllStar-Negative Kontroll-siRNA (Qiagen) transfiziert wird. Die AllStar Negative Kontroll-siRNA weist laut Hersteller keine Homologie zu bekannten Säugetiergenen auf und hat somit keinen oder nur einen geringen Effekt auf die Genexpression transfizierter Zellen.

Pro Reaktionsansatz werden in einem Well einer 6-Well Platte 15 µl einer 10 µM siRNA Stammlösung (pro siRNA 2,5 µM) in 477,5 µl OptiMEM resuspendiert. Von dem Transfektionsreagenz RNAiMAX werden 7,5 µl hinzugegeben und durch pipettieren vermischt. Nach einer 20-minütigen Inkubationszeit werden die Zellen in der gewünschten Konzentration dazugegeben. Nach 48 h erfolgt eine weitere Transfektion der Zellen mit siRNA. Hierbei werden die Zellen durch Trypsinieren geerntet, ausgezählt und auf gleicher Weise mit siRNA revers transfiziert. Nach 24 h werden die Zellen infiziert und weiter analysiert.

6.2.3 Mykoplasmentest

Um sicherzustellen, dass keine Kontamination der Zellen und Virusstocks mit Mykoplasmen vorliegt, wird eine Mykoplasmen-PCR durchgeführt. Dazu wird aus dem Zellkulturmedium oder aus Virusstock, mit Hilfe des Qiagen Viral RNA Mini Kit, DNA isoliert. Anschließend erfolgt die PCR mit der Taq DNA-Polymerase und den Mykoplasmen-spezifischen Primern (siehe Kapitel 5.5.2 und Tabelle 18). Das PCR-

Produkt wird dann auf ein 1,5 %-Agarosegel aufgetragen und bei einer Potentialdifferenz von 100 V für 45 min elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wird das Agarosegel für 30 min in Ethidiumbromid inkubiert und dann unter UV-Licht analysiert.

Tabelle 18: Komponenten und PCR-Programm für Mykoplasmen-PCR.

Reaktionsansatz		
Komponente	Volumen	
Primer # 437 (100 µM)	0,25 µl	
Primer # 438 (100 µM)	0,25 µl	
dNTPs (2 mM)	1,5 µl	
MgCl ₂ (50 mM)	0,83 µl	
JumpStart Taq DNA-Polymerase	0,5 µl	
H ₂ O	20,67 µl	
DNA	1 µl	
PCR-Programm		
Temperatur	Zeit	Wiederholung
94 °C	5 min	-
94 °C	30 sec	x 35
55 °C	30 sec	
72 °C	30 sec	
72 °C	10 min	-

6.3 Zellkultur von prokaryotischen Zellen

6.3.1 Herstellung kompetenter Bakterien (DH10B)

Für die Herstellung kompetenter Bakterien wird zunächst 1 ml einer frischen Übernachtskultur von DH10B in 100 ml LB-Medium inokuliert und bei 37 °C und einer Drehzahl von 220 U/min bebrütet. Sobald eine optische Dichte (OD₆₀₀) von 0,5 bis 0,7 erreicht ist, wird diese Bakterienkultur auf zwei 50 ml Falcon-Reaktionsgefäße aufgeteilt

und für 10 min bei 4 °C, 3000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Zellpellets in 30 ml TBF1 resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wird die Suspension bei 4 °C und 2000 U/min für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wird wieder verworfen und die Zellpellets werden in je 2 ml TBF2 resuspendiert. Diese Bakteriensuspension wird dann aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

6.3.2 Transformation und Selektion von Plasmid-DNA

Zum Einbringen von Plasmid-DNA werden entweder DH10B oder die kommerziell erhältlichen Top10 Bakterien verwendet (siehe Kapitel 5.3.1). Diese werden auf Eis aufgetaut und zu 50 µl Bakteriensuspension werden 5 ng DNA pipettiert und 30 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgt ein Hitzeschock für 45 sec bei 42 °C, gefolgt von einer 2-minütiger Inkubation auf Eis. Anschließend werden 250 µl SOC-Medium zu der Suspension gegeben und für eine Stunde bei 37 °C und 220 U/min geschüttelt. Von diesem Ansatz werden 50 µl auf eine LB-Agarplatte, die mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt wurde, ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation können dann Kolonien gepickt werden. Diese werden wiederum in LB-Medium gegeben, so dass sich die Plasmid-enthaltenden Bakterien für die Plasmid-Isolierung (siehe Kapitel 6.4.1) vermehren können.

6.4 Molekularbiologische Methoden

6.4.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Für die Isolation der Plasmid-DNA wird zunächst eine frische Übernachtskultur in 100 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum (100 µg/ml Ampicilin oder 50 µg/ml Kanamycin) angesetzt. Die DNA-Extraktion erfolgt mit dem „E.Z.N.A Plasmid Midi Kit“ der Firma Omega Bio-Tek und beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse der Bakterien, gefolgt von der Präzipitation der DNA und deren Aufreinigung über ein Säulensystem. Die Bestimmung der Konzentration erfolgt mit einem NanoDrop Spektrophotometer ND-1000.

6.4.2 DNA-Aufreinigung

Wird zum Beispiel ein Restriktionsverdau oder eine PCR durchgeführt, müssen anschließend unerwünschte Komponenten wie Proteine, Salze, Ethanol oder Chloroform beseitigt werden. Diese Aufreinigung erfolgt unter Verwendung des „QIAquick PCR Purification Kit“ nach Angaben des Herstellers.

6.4.3 RNA-Aufreinigung

6.4.3.1 RNA-Aufreinigung aus Zellen

Die RNA-Aufreinigung aus eukaryotischen Zellen erfolgt mit Hilfe des „RNeasy Mini Kit“ der Firma Qiagen nach Anleitung des Herstellers. Die Aufreinigung erfolgt durch die Bindung der RNA an eine Silika-Gel-Membran, die sich in einem Säulensystem befindet. Die aufgereinigte RNA wird in H₂O eluiert, wobei die Konzentration der RNA mit dem NanoDrop Spektrometer ND-1000 gemessen wird.

6.4.3.2 RNA-Aufreinigung aus Zellkultur-Überständen

Um RNA aus Zellkultur-Überständen zu isolieren wird das „Viral RNA Mini Kit“ der Firma Qiagen verwendet. Wie bei der RNA-Aufreinigung aus eukaryotischen Zellen (siehe Kapitel 6.4.3.1) beruht die Aufreinigung auf dem Prinzip der Bindung der RNA an eine Silika-Gel-Membran. Die Messung der Konzentration erfolgt mit dem NanoDrop Spektrometer ND-1000.

6.4.4 Quantitative *Real-Time-PCR*

Die quantitative „*Real-Time-PCR*“ (qRT-PCR, quantitative Echtzeit-PCR) ermöglicht, neben der Vervielfältigung auch die Quantifizierung von DNA-Sequenzen. Die Quantifizierung der vervielfältigten DNA gibt Rückschluss auf die RNA-Menge in den zu untersuchenden Zellen. Hierzu wird zunächst RNA isoliert (siehe Kapitel 6.4.3) und im Anschluss die Konzentration bestimmt. Für die reverse Transkription wird das „QuantiTect Reverse Transcription Kit“ der Firma Qiagen verwendet. Dieses Kit beinhaltet ebenfalls einen Aufreinigungsschritt der RNA, bei dem der Verdau der zellulären DNA stattfindet. Gleiche Volumen an RT-Reaktionen werden dann als Matrizen für die Echtzeit-PCR mit dem „QuantiTect SYBR Green PCR Kit“ verwendet, das kommerzielle, validierte QuantiTect-Primer für alle Wirts-RNA-Targets verwendet. RVFV-L-RNA wird unter Verwendung von veröffentlichten TaqMan-Primern und Sonden (16) und dem „SensiMix II Probe Kit“ nachgewiesen. Alle Reaktionen finden in einem „StepOne Real-Time PCR System“ der Firma Applied Biosystems statt, wobei die relativen RNA-Mengen mit der $\Delta\Delta C_t$ -Methode ermittelt werden. Als interne Kontrolle wird die ribosomale 18S RNA verwendet (für Programme siehe Tabelle 19). Um Kontaminationen aus genomischer DNA oder anderen Quellen auszuschließen, werden zwei zusätzliche Reaktionen pro zu analysierendem Gen angesetzt, einmal eine Reaktion ohne Matrize und eine Reaktion mit Matrize, jedoch ohne RT-Reaktion.

Tabelle 19: Übersicht verwendeter qPCR-Programme.

qPCR-Programm für das QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit von Qiagen		
Temperatur	Zeit	Wiederholung
50°C	30 min	-
95°C	15 min	-
94°C	15 sec	x 35
55°C	30 sec	
72°C	30 sec	
72°C	10 min	-
qPCR-Programm für das SensiMix II Probe Kit		
Temperatur	Zeit	Wiederholung
95°C	10 min	-
95°C	15 sec	x 40
60°C	1 min	

6.5 Proteinbiochemische Methoden

6.5.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen wird eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (engl.: *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) durchgeführt. Nicht-kovalente Proteinbindungen werden durch das SDS aufgebrochen, was zur Denaturierung führt. Zusätzlich bildet SDS mit Proteinen negativ geladene SDS-Protein-Komplexe mit konstantem Ladungs-Masse-Verhältnis. Diese Eigenschaft erlaubt die Auftrennung der Proteine entsprechend ihres Molekulargewichts. Die Polyacrylamid-Gele bestehen aus einem 4 %-igen Sammelgel und, je nach Molekulargewicht der aufzutrennenden Proteine, einem höherprozentigen Trenngel. Für Proteine von 10 bis 120 kDa wird ein 12 %-iges Trenngel, für Proteine über 120 kDa werden 5 %-ige Trenngele oder 4-8 %-ige Criterion™ Gele verwendet.

Zellen werden mit einem SDS-Probenpuffer lysiert, und in ein Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 100 °C gekocht. Von dem Lysat werden 10 bis 15 µl auf dem Gel aufgetragen und die Elektrophorese wird bei einem Strom von 25 mA pro Gel so lange

durchgeführt, bis die Laufbande des Probenpuffers den unteren Rand des Polyacrylamid-Gels erreicht.

6.5.1.1 Semidry-Western-Blot

Für alle 12 %-igen Gele wird der Semidry-Western-Blot durchgeführt. Hierbei wird die Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF) zuerst für 30 s in 100 % Methanol aktiviert. Sowohl die Filterpapiere als auch die Membran und das SDS-Gel werden kurz in Semidry-Blotting-Puffer inkubiert. Von unten nach oben werden zwei Filterpapiere, Membran, Gel und zwei weitere Filterpapiere aufeinandergelegt und in eine Transferkammer (Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell von Bio-Rad) gelegt. Der Transfer erfolgt bei einer Potentialdifferenz von 10 V für 60 min.

6.5.1.2 Wet-Western-Blot

Für alle 5 %-igen Gele wird der Wet-Western-Blot durchgeführt. Hierbei erfolgt der Transfer von Gel auf PVDF-Membran in einer Kammer, die komplett mit dem Transferpuffer (Towbin-Puffer) gefüllt ist. Wie beim Semidry-Western-Blot erfolgt eine Aktivierung der PVDF-Membran mit Methanol. Anschließend werden die Komponenten in Towbin-Puffer gelegt. Der Transfer erfolgt in einer Mini Trans-Blot Cell von Bio-Rad bei einem Strom von 250 mA für 90 min bei +4 °C.

6.5.1.3 Criterion System

Für die 4-8%-igen Criterion™ Gele von BioRad wird ebenfalls ein Wet-Western-Blot durchgeführt (siehe Kapitel 6.5.1.2). Allerdings werden hier die PVDV-Membranen mit Ethanol aktiviert und der Transfer-Puffer (*XT Tricine Running Buffer*) wurde kommerziell von BioRad erworben. Der Transfer erfolgt bei einem Strom von 40 mA, bei +4 °C über Nacht.

6.5.2 Antikörperfärbung

Für eine Antikörperfärbung wird die Membran mit 5 % Milchpulver in TBS-T für 1 h bei Raumtemperatur abgesättigt, um unspezifische Bindungen zu verhindern. Nach drei Waschschritten mit TBS-T wird die Membran mit dem jeweiligen Primärantikörper für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Entfernung ungebundener Antikörper wird die Membran dreimal für jeweils 15 min bei Raumtemperatur mit TBS-T gewaschen. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgt ebenfalls für 1 h bei Raumtemperatur. Sowohl Primär- als auch Sekundärantikörper werden in 5 % Milchpulver in TBS-T verdünnt. Die jeweiligen Verdünnungen sind Kapitel 5.4 zu entnehmen. Die Membran

wird erneut zweimal mit TBS-T und abschließend einmal mit TBS für jeweils 10 min gewaschen.

Die Detektion der Proteine erfolgt mittels Chemolumineszenz unter der Verwendung von „SuperSignal West Femto/Pico Maximum Sensitivity Substrate“. Hierbei katalysiert HRP (engl.: horseradish peroxidase), das an den Sekundärantikörper gekoppelt ist, die Umsetzung des Substrats auf Luminol-Basis. Die emittierte Lumineszenz wurde mit dem ChemiDoc XRS+ detektiert.

6.6 Immunfluoreszenz-Analyse

6.6.1 Indirekte Immunfluoreszenz-Analyse

Für diese Methode werden eukaryotische Zellen auf Deckgläser ausgesät und, je nach Fragestellung, transfiziert oder infiziert. Nach der versuchsabhängigen Inkubationszeit werden die Deckgläser dreimal mit PBS_{def} gewaschen und dann mit 4 % PFA in PBS_{def} für 30 min bei Raumtemperatur fixiert. Nachdem die Zellen dreimal für 15 min mit PBS_{def} gewaschen wurden, erfolgt die Permeabilisierung. Hierbei wird 0,5 % Triton-X100 in PBS_{def} auf die Zellen gegeben und für 10 min inkubiert. Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, werden die Deckgläser mit 1 % FCS in PBS_{def} behandelt, das für 30 min auf die Zellen gegeben wird. Im Anschluss erfolgt die Inkubation mit Primärantikörpern für 1 h bei Raumtemperatur. Die Antikörper werden in 1 % FCS in PBS_{def} verdünnt. Die Informationen zu den verwendeten Antikörpern und deren Verdünnung können Kapitel 5.4 entnommen werden. Zur Entfernung ungebundener Antikörper werden die Deckgläser dreimal für je 5 min mit PBS_{def} gewaschen. Anschließend werden die Deckgläser mit entsprechenden Sekundärantikörper mit kovalent gebundenen Fluorochromen im Dunkeln inkubiert. Zu der eingesetzten Antikörperversdünnung wird ebenfalls 4',6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI) in einer 1:10000 Verdünnung gegeben. DAPI interkaliert in die kleine Furche doppelsträngiger DNA und dient somit zur Darstellung der Zellkerne. Nach der Inkubation werden die Deckgläser dreimal mit PBS_{def} gewaschen und abschließend mit Wasser gespült. Die Deckgläser werden dann auf Objektträger gegeben und mit 8 µl FluorSave Reagenz behandelt. Die optische Untersuchung der Proben erfolgt an einem konfokalen Laserrastermikroskop.

6.6.2 Oligo(dT)- *in situ* Hybridisierung

Mit der Methode der Oligo(dT) *in situ* Hybridisierung lässt sich die Lokalisierung von poly(A)-RNA untersuchen.

Auf Deckgläser werden eukaryotische Zellen ausgesät und über Nacht bei Standardbedingungen kultiviert. Nach Infektion bzw. Transfektion werden die Deckgläser zweimal mit PBS_{def} gewaschen und anschließend mit 4 % PFA in PBS_{def} für 8 min bei Raumtemperatur fixiert. Nach drei Waschschritten à 15 min mit PBS erfolgt die Permeabilisierung mit 0,5 % Triton X-100 in PBS_{def} für 15 min bei Raumtemperatur. Es folgen drei Waschschrritte mit PBS_{def}. Die Zellen werden für 1 h mit dem Primärantikörper inkubiert, wobei der Antikörper in sterilem PBS, das 0,2 % Triton X-100, 1 mM DTT und 200 U/ml RiboLock enthielt, verdünnt wird. Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper werden die Zellen dreimal mit 0,2 % Triton X-100 in PBS_{def} gewaschen, um nicht-gebundene Antikörper zu entfernen. Dann erfolgt erneut eine Fixierung mit 4 % PFA in PBS_{def}. Um eine unspezifische Hybridisierung der Sonde zu verhindern, werden 100 µl der Prä-Hybridisierungslösung auf die Deckgläser gegeben und für 15 min in einer Feuchte-Kammer bei 42 °C äquilibriert. Anschließend werden die Deckgläser mit der Hybridisierungslösung über Nacht bei 42 °C in einer Feuchte-Kammer inkubiert und am nächsten Tag zweimal mit 2-fachem SSC und einmal mit 0,5-fachem SSC für 15 min bei 42 °C gewaschen. Beide Lösungen werden bei 42 °C vorgewärmt. Nach den Waschschrritten erfolgt eine erneute Fixierung mit 4 % PFA. Schließlich werden die Deckgläser für 1 h mit DAPI und Sekundärantikörpern, die mit Fluorophoren gekoppelt sind, inkubiert. Nach der Entfernung ungebundener Antikörper durch drei Waschschrritte mit PBS_{def} werden die Deckgläser auf Objektträger gegeben und mit 8 µl FluorSave Reagenz behandelt. Die optische Charakterisierung der Proben erfolgt an einem konfokalen Laserrastermikroskop.

6.7 Heterokaryon-Assay

Der Heterokaryon-Assay wird verwendet, um zu bestimmen ob, ein nukleäres Protein in der Lage ist, sich zwischen Zellkern und Zytoplasma hin- und her zu bewegen. Diese Methode basiert auf der Fusion von Donor- und Empfängerzellen zweier verschiedener Spezies, die anhand ihrer Chromatinmuster unterschieden werden können und der Beobachtung, ob das entsprechende Protein in der Lage ist von dem Zellkern der Donorzelle in den Zellkern der Empfängerzelle überzugehen. Im Kontext dieser Arbeit wird diese Methode zur Untersuchung verwendet, ob ein GFP mit einer NLS einer nicht-infizierten Zelle in der Lage ist, in den Zellkern einer mit RVFV-infizierten Zelle zu gelangen.

In dieser Arbeit werden HeLa-Zellen als Donorzellen verwendet und 16 h vor der Durchführung des Heterokaryon-Assays mit entweder pEGFP-NLS oder pEGFP-M9 transfiziert (siehe 6.2.2). Parallel dazu werden NIH3T3-Zellen mit RVFV MP-12 (MOI=3)

infiziert. Nach den 16 h werden die Zellen trypsiniert, die Zellzahl bestimmt und eine 1:1 Zellsuspension aus Donor- und Empfängerzellen mit einer Endkonzentration von 1×10^6 Zellen hergestellt. Drei weitere 2-fache Serienverdünnung (1:2 – 1:8) werden durchgeführt, um eine optimale Zelldichte für Fusion und Mikroskopie zu gewährleisten. Für jede Kombination von Donor- und Empfängerzelle werden 4 sterile Deckgläser in die Vertiefungen einer 12-Well-Platte gegeben und die Zellsuspensionen hinzugegeben. Die Zellen werden dann für 3 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, damit sie auf den Deckgläsern anhaften. Um eine weitere Proteinsynthese zu verhindern, wird dem Medium 50 µg/ml Cycloheximid (CHX) hinzugegeben. Um die Zellen zu fusionieren werden nach den 3 h das Medium abgesaugt, einmal mit PBS_{def} gewaschen und dann werden für 2 min 250 µl PEG 1500 (Polyethylenglycol) auf die Zellen gegeben. Das PEG 1500 wird dann mit 3 Waschschritten mit PBS_{def} entfernt und dann wird Medium mit 100 µg/ml CHX hinzugefügt. Nach 3 h bei 37 °C und 5 % CO₂ werden die Zellen mit 4 % PFA in PBS_{def} fixiert, sodass die Immunfluoreszenzfärbung (siehe Kapitel 6.6.1) durchgeführt werden kann.

6.8 Ko-Immunoprecipitation

Mögliche Interaktionen von NSs wurden mit Hilfe einer „GFP-Trap“ der Firma ChromoTek untersucht. Plasmide, die sowohl für die potenziellen HA-markierten Interaktionspartnern als auch für ein GFP-getaggttes NSs kodieren, werden am Tag zuvor separat in HEK293-Zellen transfiziert. Die Zellen werden einmal mit kaltem PBS_{def} gewaschen und dann in frisches PBS_{def} aus der 10 cm-Schale abgeschabt. Die Zellsuspensionen werden bei 800 U/min zentrifugiert, der Überstand anschließend verworfen und das Zellpellet wird dann in 250 µl RIPA Puffer resuspendiert und für 20 min im Drehrad inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 5000 U/min für 5 min bei +4 °C zentrifugiert. Die Überstände werden dann in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, wobei die Lysate von GFP-NSs transfizierten Zellen mit den übrigen Lysaten gemischt wurden. Von den vermischten Lysaten werden 50 µl entnommen und mit 12,5 µl 4-fachem Probenpuffer versetzt. Diese Suspension dient später als Input-Probe. Die verbleibende Menge an Probe wurde dann in die Vertiefungen der „GFP-Trap“ gegeben und für 1 h bei +4 °C inkubiert. Danach wird der Überstand abgesaugt und dreimal mit RIPA Puffer gewaschen. Die Elution erfolgte durch Zugabe von 40 µl 1-fachen SDS-Probenpuffer für 15 min. Die Analyse erfolgte mittels SDS-PAGE und Western Blot.

6.9 Kern-Zytoplasma Fraktionierung

Die Fraktionierung wird angewandt, um zu untersuchen ob die Verteilung von Proteinen in der Zelle durch eine Infektion mit dem RVFV verändert wird. Hierzu werden die zytoplasmatischen Bestandteile von den Zellkernen getrennt und die einzelnen Fraktionen werden mit Hilfe der Massenspektrometrie analysiert.

Am Vortag werden 3×10^6 Huh7-Zellen ausgesät und am nächsten Tag mit MP-12 oder Clone 13 (MOI 5) infiziert beziehungsweise mit den Transkriptionsinhibitoren α -Amanitin oder Actinomycin D behandelt. Nach 6 h und 24 h werden die Zellen einmal mit kaltem PBS_{def} gewaschen und in 10 ml kaltem PBS_{def} abgeschabt. Anschließend wurden die Ansätze bei 2000 U/min und +4 °C für 5 min zentrifugiert. Das PBS_{def} wird dann abgesaugt und das Zellpellet in 500 μ l 0,1 % NP-40 in PBS resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Hiervon werden dann 100 μ l als Gesamtlysate in ein neues Gefäß überführt. Der Rest des Lysates wird zentrifugiert, um die Zellkerne zu sedimentieren. Der Überstand ist die zytoplasmatische Fraktion und wird in ein neues Gefäß überführt. Die Zellkerne werden einmal mit PBS gewaschen, zentrifugiert, und das Pellet in 100 μ l RIPA Puffer, der mit Protease-Inhibitoren supplementiert ist, resuspendiert. Nach einer Inkubation auf Eis für 10 min werden die Proben zentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß transferiert. Diese Probe ist die Kern-Fraktion. Soweit nicht anders angegeben ist, erfolgten die Zentrifugationsschritte bei 13000 U/min und +4 °C für 10 min. Zur Qualitätskontrolle werden jeweils 10 μ l des Gesamtlysates und der Fraktionierungen mit SDS-Probenpuffer versetzt und es wird ein Western Blot durchgeführt.

Die massenspektrometrische Analyse erfolgt in Kooperation mit Dr. Uwe Linne am Fachbereich für Chemie der Philipps-Universität Marburg.

6.10 Renilla-Luciferase Assay

Das „Renilla-Luciferase-Assay System Kit“ der Firma Promega wird in dieser Arbeit für die Bestimmung der viralen Genexpression verwendet. Nach der Transkription und Translation der Renilla-Luciferase, die ins virale Genom integriert ist, fungiert sie als genetischer Reporter, indem sie die Oxidation des Substrates (Coelenterat-Luciferin) katalysiert, das Lichterzeugung zur Folge hat.

Um die Genexpression zu bestimmen, müssen die Zellen zuerst lysiert werden. Hierfür wird das Zellkulturmedium abgesaugt, die Zellen mit PBS_{def} gewaschen und dann mit 1-fachem Lysepuffer auf einem Schüttler für 15 min inkubiert. Für die Analyse werden 20 μ l des Lysates in eine 96-Well Platte überführt, und die Platte im Luminometer gelesen.

Das Luciferase Assay Reagenz wird in die Vertiefungen injiziert und die Lumineszenz wird über 10 Sekunden mit einer Verzögerung von 2 Sekunden integriert.

7 Ergebnisse

Das RVFV-NSs ist ein multifunktionales Protein, das die Wirtszelle über mindestens drei unabhängige Mechanismen manipulieren kann. Es fördert den Abbau der PKR und induziert darüber hinaus einen Transkriptionsblock. Zudem unterdrückt NSs spezifisch die Induktion des Typ-I-Interferonsystems. Da das NSs jedoch ein sehr starker Interferon-Antagonist ist, wird in dieser Arbeit die Frage geklärt, ob das NSs zusätzliche Strategien verfolgt. Speziell soll dabei, basierend auf den Erkenntnissen einer Interaktionsstudie in Kooperation mit Andreas Pichlmair und Guilio Superti-Furga (158), die Rolle von NSs im Rahmen von zellulären Transportwegen untersucht werden.

7.1 RVFV-NSs induziert einen mRNA Exportblock

Massenspektrometrische Analysen in Kooperation mit Andreas Pichlmair und Guilio Superti-Furga (158) zeigen, dass das NSs mit den mRNA-Exportfaktoren Rae1 und Nup98 interagiert. Nup98 ist Bestandteil des NPCs und ist essenziell für den mRNA-Export. Ebenso wichtig ist der mRNA-Exportfaktor Rae1, welcher direkt an poly(A)-RNA bindet und den Export der RNA, unter anderem über eine Interaktion mit Nup98 vermittelt. Aus diesem Grund lässt sich vermuten, dass der mRNA-Export in Anwesenheit von NSs gestört wird. Zur Klärung wurde in dieser Arbeit anhand der Oligo(dT) *in situ* Hybridisierung die Lokalisation von poly(A)-RNA bestimmt. Bei dieser Methode werden Fluorophor-gekoppelte Sonden verwendet, die komplementär zum poly(A)-Schwanz der mRNAs sind. Da die RNA des RVFV keinen poly(A)-Schwanz besitzt, binden die Sonden spezifisch an die mRNA der Wirtszelle. HeLa-Zellen wurden mit einer MOI von 3 mit den rekombinanten, Flag-markierten Viren rZH-CF-NSs und rZH-NF-ΔMx für 6 h infiziert. Das Virus rZH-NF-ΔMx ist wie das rZH-CF-NSs ein rekombinanter ZH548 Stamm, wobei hier das NSs durch 3xNF-ΔMx ersetzt wurde und als Negativkontrolle dient.

Die mikroskopischen Aufnahmen dieser Oligo(dT) *in situ* Hybridisierung (Abbildung 6 A) zeigen die Lokalisation der mRNA in nicht-infizierten Zellen im Zytoplasma. Ebenso zeigt sich eine zytoplasmatische Verteilung der mRNA in rZH-3NF-ΔMx-infizierten Zellen. Im Gegensatz dazu akkumuliert in rZH-CF-NSs-infizierten Zellen die poly(A)-RNA im Zellkern, da das Signal der poly(A)-RNA nun fast ausschließlich im Zellkern zu beobachten ist. Dies wurde mittlerweile auch von der Arbeitsgruppe Schmaljohn beobachtet und publiziert (37).

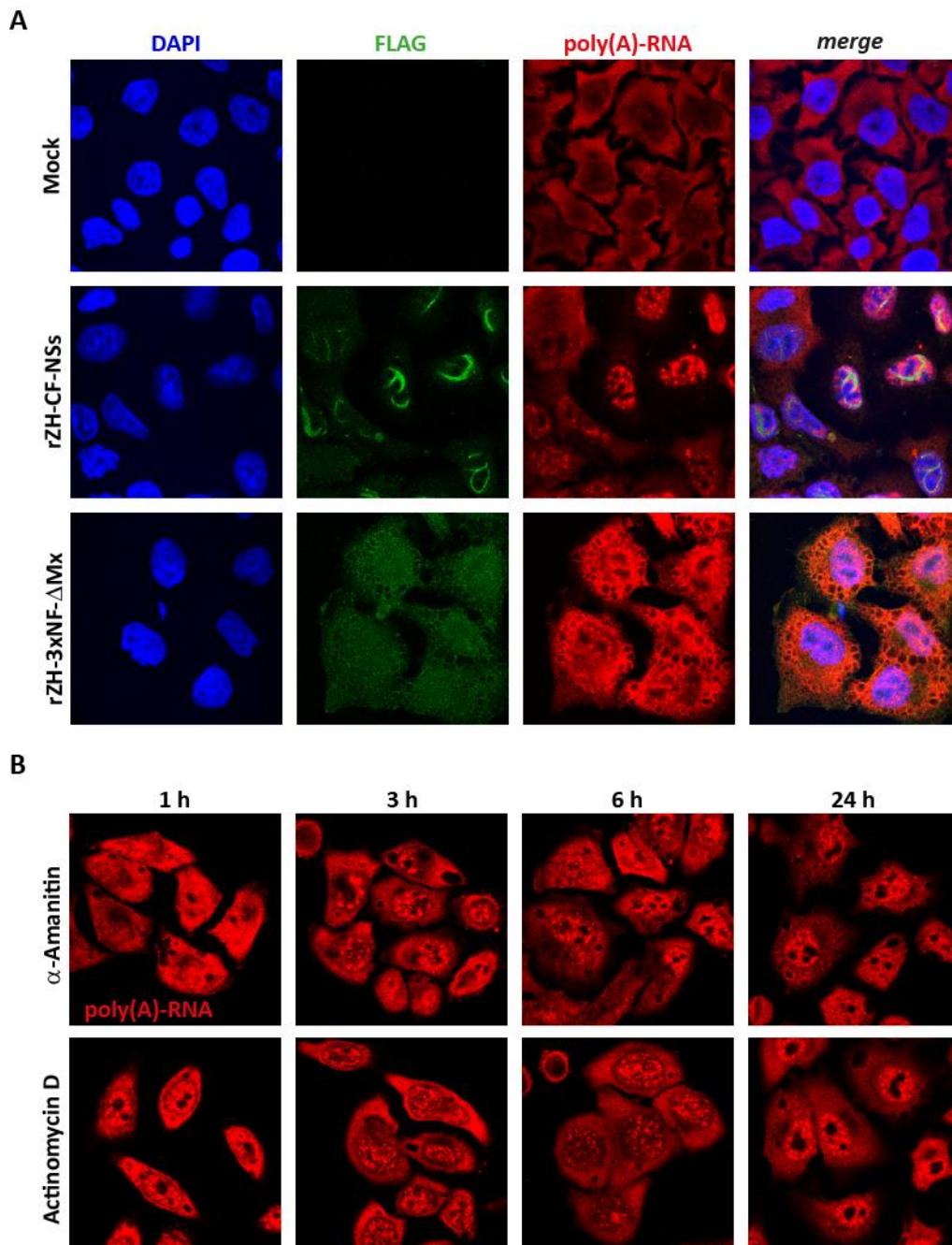


Abbildung 6 KLSM-Aufnahmen zur Ermittlung der Lokalisation der poly(A)-RNA mittels Oligo(dT) *in situ* Hybridisierung. **(A)** HeLa-Zellen wurden mit einer MOI von 3 mit Flag-markierten rZH-CF-NSs oder Flag-markierten rZH-3xNF-ΔMx für 6 h infiziert. Anschließend erfolgte die Oligo(dT) *in situ* Hybridisierung gefolgt von der Färbung gegen FLAG-NSs und DAPI. **(B)** HeLa-Zellen wurden mit den Transkriptionsinhibitoren α-Amanitin (10 µg/ml) und Actinomycin D (10 µg/ml) behandelt, gefolgt von einer Oligo(dT) *in situ* Hybridisierung.

Um auszuschließen, dass der beobachtete Phänotyp auf die durch NSs gehemmte Transkription zurückzuführen ist, wurden im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit die Zellen mit den Transkriptionsinhibitoren α-Amanitin und Actinomycin D behandelt. Die Kinetik in Abbildung 6 B zeigt, dass beide Transkriptionsinhibitoren ebenfalls die mRNA im Kern zurückhalten, allerdings wesentlich später als NSs. Die Inhibitoren wirken sofort

auf die Zelle und nicht stufenweise im Vergleich zu NSs, welches zuerst von der Zelle exprimiert werden muss. Somit ist die Akkumulation von poly(A)-RNA im Zellkern wahrscheinlich eine frühe Auswirkung der NSs-Expression, die sowohl unabhängig vom Transkriptionsblock als auch zeitlich vor dem Transkriptionsblock erfolgt.

7.2 Nup98 und Rae1

Die Ergebnisse aus Kapitel 7.1 zeigen, dass NSs in den mRNA-Export eingreift. Das NSs-Interaktom identifiziert Nup98 und Rae1 als Interaktionspartner von NSs (158). Da beide zellulären Faktoren essenziell für den mRNA-Export sind, wird nun untersucht, ob NSs über diese Faktoren den Exportblock induziert.

7.2.1 Lokalisierung und Level von Nup98 und Rae in RVFV-infizierten Zellen

Da das NSs zelluläre Proteine meistens sequestriert oder deren proteasomalen Abbau induziert, wurden HeLa Zellen mit den rekombinanten Viren rZH-CF-NSs und rZH-NF-ΔMx infiziert und via Western Blot und Immunfluoreszenz analysiert.

Die Immunfluoreszenz-Analyse in Abbildung 7 A zeigt, dass das NSs weder einen Abbau noch eine Relokalisation von Nup98 induziert. Zudem ist auch keine Kolokalisation mit NSs zu erkennen. Da für Immunfluoreszenzen geeignete Antikörper für Rae1 zum Zeitpunkt dieser Arbeit nicht zu beziehen sind, kann über Relokalisation oder Kolokalisation von Rae1 keine Aussage getroffen werden. Darüber hinaus zeigt der Western Blot in Abbildung 7 B, dass weder die Spiegel von Nup98 noch von Rae1 abnehmen. Als Positivkontrolle für den proteasomalen Abbau durch NSs wurde gegen TFIIF-p62 gefärbt, das wie erwartet abgebaut wird.

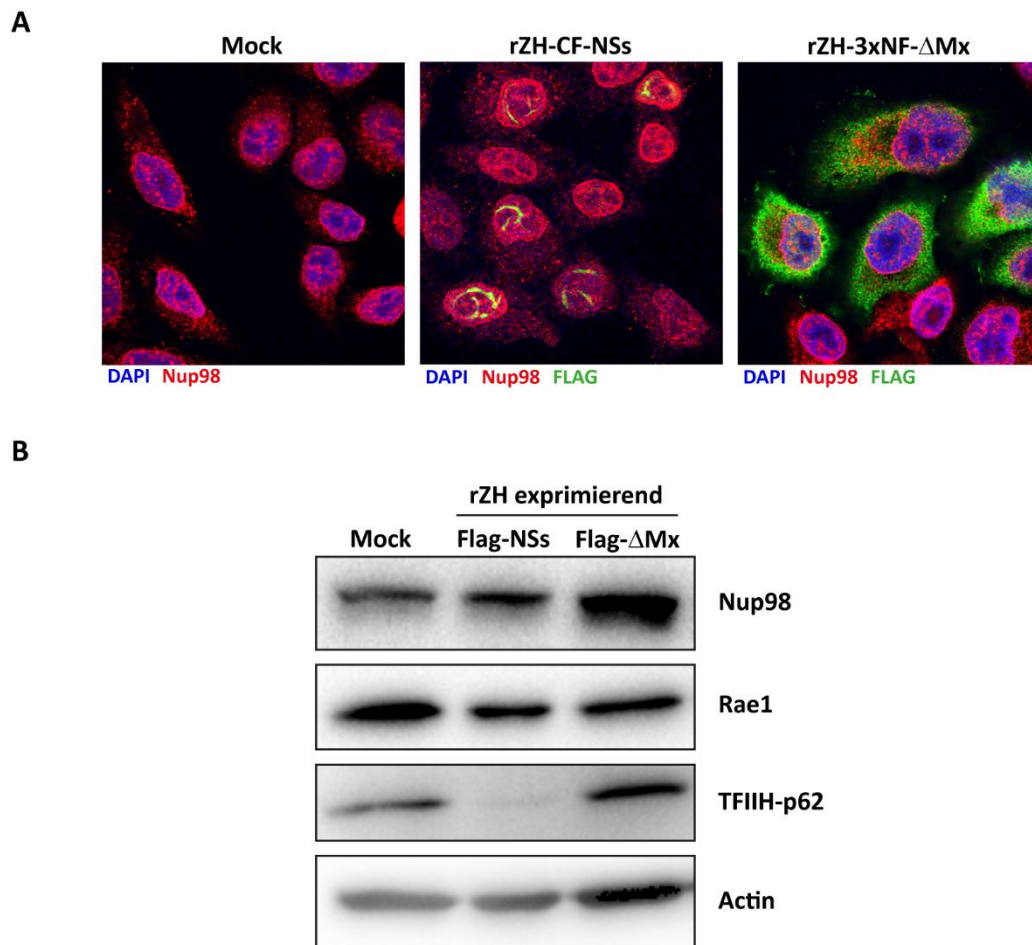


Abbildung 7 Status von Nup98 und Rae1 im Kontext einer RVFV-Infektion. **(A)** KLSM-Aufnahmen zur Untersuchung der Lokalisation von Nup98: HeLa-Zellen wurden mit rZH-CF-NSs oder rZH-3xNF-ΔMx mit einer MOI von 3 für 6 h infiziert. Nach der Fixierung erfolgte eine Immunfluoreszenzfärbung gegen FLAG und Nup98. **(B)** Western Blot-Analysen zur Bestimmung der Proteinlevel: HeLa-Zellen wurden mit einer MOI von 5 mit rZH-CF-NSs und rZH-3xNF-ΔMx für 16 h infiziert und anschließend lysiert. Die Level von Nup98, Rae1, TFIIH-p62 und Actin wurden mittels Western Blot bestimmt.

7.2.2 Überprüfung der Interaktion von RVFV NSs mit Nup98 und Rae1

Um die Interaktions-Daten zu verifizieren wurden Ko-Immunopräzipitationen mittels GFP-Trap durchgeführt. Hierfür wurden HEK239-Zellen mit Plasmiden transfiziert, die für HA-markiertes Nup98 und Rae1 kodieren. Als Negativkontrolle diente ein Plasmid, das für die ersten 100 Aminosäuren des N-Terminus von MxA kodiert (HA-ΔMx) und ebenfalls HA-markiert ist. Ein Plasmid, das für den HA-markierten NSs-Interaktor FBXW11 (99) kodiert, wurde als Positivkontrolle verwendet. Ebenso wurden Zellen mit Plasmiden transfiziert, die für GFP-markiertes NSs kodieren. Nach 24 h wurden die Zellen lysiert, wobei die Lysate von GFP-NSs transfizierten Zellen mit den übrigen Lysaten gemischt und in die Vertiefungen der GFP-Trap gegeben wurden. Proteine, die mit NSs

interagieren bleiben an NSs hängen und können nach den Waschschritten eluiert und mittels Western Blot analysiert werden.

Der Western Blot in Abbildung 8 zeigt, dass alle Proteine im Input nachzuweisen sind, allerdings unterscheidet sich das Expressionsniveau von Rae1 stark von den anderen Proteinen. Die Ko-Immunopräzipitation zeigt, dass NSs nicht mit der Negativkontrolle, aber mit der Positivkontrolle interagiert. Allerdings kann die Interaktion von NSs mit Nup98 und Rae1 nicht eindeutig verifiziert werden. Aus diesen Daten wird ersichtlich, dass Nup98 und Rae1, im Gegensatz zu anderen NSs-Zielen, nur vorübergehend und ohne Konsequenzen für die Lokalisation oder Stabilität mit NSs interagieren.

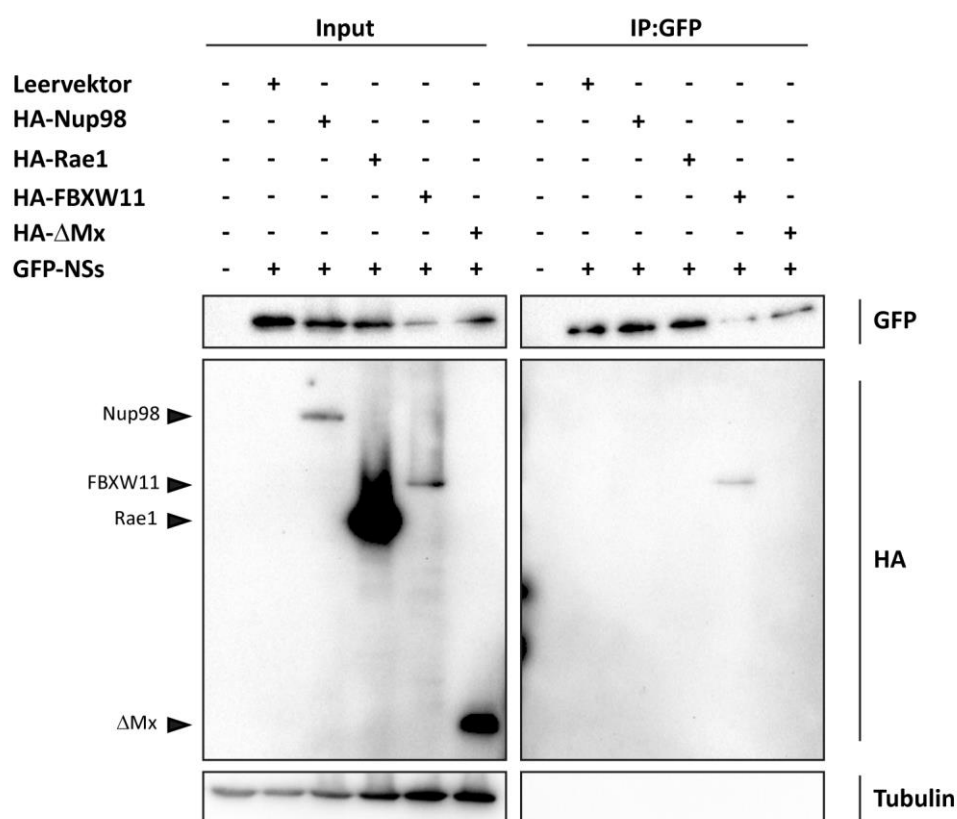


Abbildung 8 Überprüfung der Interaktion von NSs mit Nup98 und Rae1 mittels Ko-Immunopräzipitation. HEK293-Zellen wurden mit den jeweiligen Plasmiden transfiziert und nach 24 h lysiert. Nachdem die Lysate gemischt wurden, erfolgte die Ko-Immunopräzipitation mittels GFP-Trap.

7.2.3 Bedeutung von Nup98 und Rae1 für die RVFV-Infektion

Um herauszufinden, ob Rae1 und Nup98 wichtig für den Replikationszyklus von RVFV sind, erfolgte ein *knock-down* dieser mRNA-Exportfaktoren und eine anschließende Infektion mit rZH-CF-NSs und rZH-NF- Δ Mx. Zur Auswertung folgt zunächst eine Immunfluoreszenzanalyse (Abbildung 9 A) sowie die Ermittlung der *knock-down*-Effizienz (Abbildung 9 B).

Bei Zellen, die mit der Kontroll-siRNA transfiziert wurden ist die charakteristische nukleäre Lokalisation der NSs-Filamente zu erkennen. Bei dem Nup98-*knock-down* nimmt der zytoplasmatische Anteil an NSs zu. Dennoch wird weiterhin TFIIH-p62, das im Zellkern lokalisiert, abgebaut. Dies geschieht vermutlich durch das restliche NSs, welches sich noch im Kern befindet. Als Kontrolle für das Nup98 wurde hier das Nup62 verwendet. Letzteres befindet sich im Zentralkanal der Kernpore und assoziiert, wie das periphere Nup98, mit dem Importin- α/β -Komplex und vermittelt den Proteintransport. Bei einem Nup62 *knock-down* nimmt das zytoplasmatische Signal von NSs zu, allerdings wesentlich geringer als bei einer Nup98-Depletion und erreicht auch keine statistische Signifikanz (zweiseitiger, gepaarter Student's t-Test; $p=0,10$; * $p<0,05$). Trotzdem scheint der Kernimport von NSs stärker von Nup98 abhängig zu sein als von Nup62, was sich in einem höheren Anteil an zytoplasmatischen NSs im Zytoplasma beim Nup98 *knock-down* manifestiert (siehe Abbildung 9 C). Darüber hinaus könnte die leichte Beeinträchtigung des NSs-Imports im Kontext des Nup62 *knock-downs* auch durch die Beobachtung erklärt werden, dass die Nup98-Level durch die siRNA-Depletion von Nup62 beeinflusst werden können, erkennbar durch die geringeren Proteinlevel von Nup98 im zugehörigen Western Blot (siehe Abbildung 9 B).

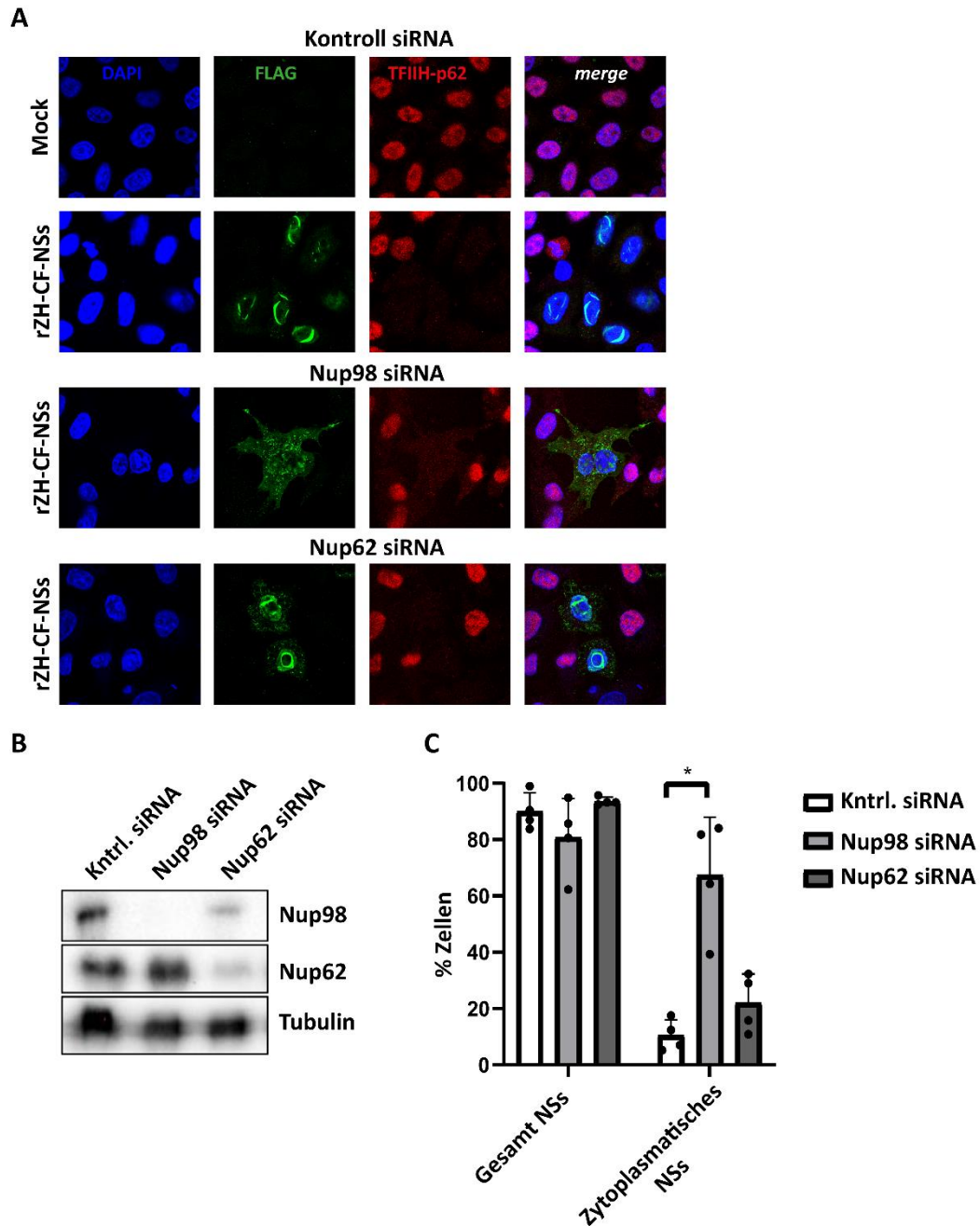


Abbildung 9 Bedeutung von Nup98 für die RVFV-NSs Lokalisation. **(A)** KLSM-Aufnahmen zur Bestimmung der NSs-Lokalisation: HeLa-Zellen wurden mit entsprechenden siRNAs transfiziert und nach 72 h mit rZH-CF-NSs für 24 h mit einer MOI von 3 infiziert. Nach der Fixierung erfolgte eine Immunfluoreszenzfärbung gegen FLAG-NSs und TFIIH-p62. **(B)** Western Blot zur Verifizierung des *knock-downs*: Zellen wurden 72 h nach der siRNA-Transfektion lysiert und die Anwesenheit von Nup98 und Nup62 untersucht. **(C)** HeLa-Zellen aus (A) wurden quantifiziert. Aus vier biologischen Replikaten wurden etwa 100 infizierte Zellen pro Replikat auf das Vorhandensein von NSs und die zytoplasmatische Lokalisation von NSs überprüft. Die statistische Signifikanz wurde mittels zweiseitigem, gepaarten Student's t-Test ermittelt ($p=0,01$; * $p<0,05$).

Des Weiteren wurden Virustiter mittels *Immunofocus*-Assay bestimmt (Abbildung 10 A). Der Titer des wildtypischen (WT) rZH548-Stammes reduzierte sich in Abwesenheit von Nup98 und Rae1 um den Faktor 10, jedoch nicht, wenn Nup62 depletiert wurde. Überraschenderweise wurde der Titer des NSs-deletierten Stammes Clone 13 ebenfalls reduziert, auch wenn die ermittelten Konzentrationen mittels zweiseitigem, gepaarten Student's t-Test keine statistische Signifikanz erreichen ($p=0,84$; * $p<0,05$). Daher benötigt das RVFV die beiden Faktoren möglicherweise für eine allgemeine Funktion bei der Virusreplikation. Darüber hinaus führt eine Nup98-Depletion zu keiner IFN-Induktion durch WT-RVFV, das mit der noch vorliegenden TFIIH-p62-Zerstörung durch NSs unter diesen Bedingungen übereinstimmt. Dies gilt ebenso für eine Rae1- und Nup62-Depletion (Abbildung 10 B).

Eine mögliche Aufhebung oder Verminderung der NSs-vermittelten IFN-Suppression durch die Nup98-Depletion könnte jedoch aufgrund eines allgemeinen Defekts beim Kernimport von Transkriptionsfaktoren für die IFN- β -Promoteraktivierung verborgen sein. Die Auswertung offenbart in der Tat eine Verringerung der starken IFN-Induktion durch den NSs-deletierten Stamm Clone 13, wenn Nup98 und Rae1 fehlen. Allerdings wird auch hier keine statistische Signifikanz erreicht. Die beobachtete verringerte IFN-Induktion könnte auf den erwähnten Transportdefekt durch die Nup98-Depletion zurückzuführen sein. Aufgrund der Rolle von Nup98 bei der Expression von antiviralen Genen wird diese Verringerung jedoch erwartet (153)

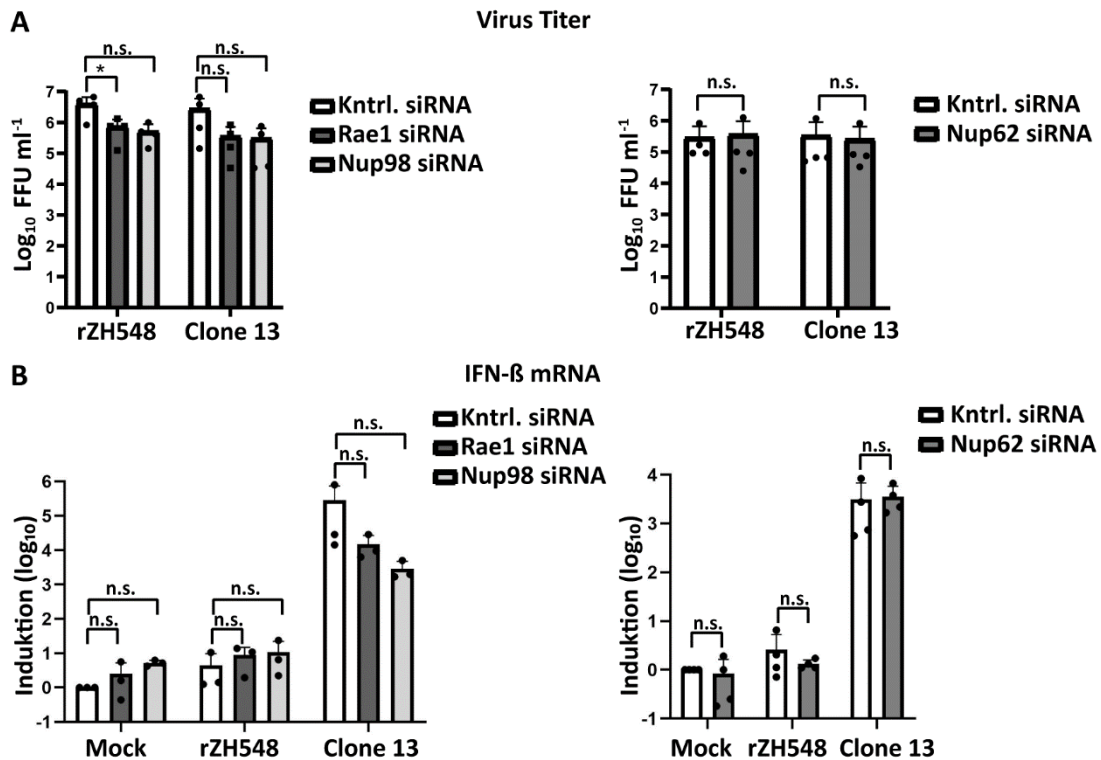


Abbildung 10 Einfluss von Nup98, Rae1 und Nup62 auf die RVFV Infektion und IFN-Induktion. HeLa-Zellen wurden mit siRNAs gegen Nup98, Rae1 und Nup62 transfiziert und 72 h später mit rZH548 und Clone 13 mit einer MOI von 10 infiziert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der **(A)** Virus-Titer mittels *Immunofocus*-Assay und die Bestimmung der **(B)** IFN-β-Induktion mittels qRT-PCR. Die statistische Signifikanz wurde mittels zweiseitigem, gepaarten Student's t-Test ermittelt (* $p < 0,05$).

7.3 mRNA Exportfaktoren

Die in Kapitel 7.2 beschriebenen Daten können bisher nicht vollständig erklären, wie es zu dem NSs-induzierten mRNA-Exportblock kommt. Aus diesem Grund wird nun der Status von weiteren essenziellen mRNA-Exportfaktoren im Rahmen einer RVFV-Infektion untersucht. Hierfür wurden HeLa-Zellen mit dem WT rZH548 und dem NSs-deletierten Stamm Clone 13 infiziert und nach 24 h via Western Blot und Immunfluoreszenz untersucht. Es wurden Thoc2, UAP56, Crm1, PABP, NXF1, Rae1, DDX19 und ALY zur Analyse ausgewählt. Immunfluoreszenzfärbungen gegen Crm1 und Rae1 konnten allerdings nicht durchgeführt werden, da zu diesem Zeitpunkt keine geeigneten Antikörper für diese Anwendung verfügbar waren.

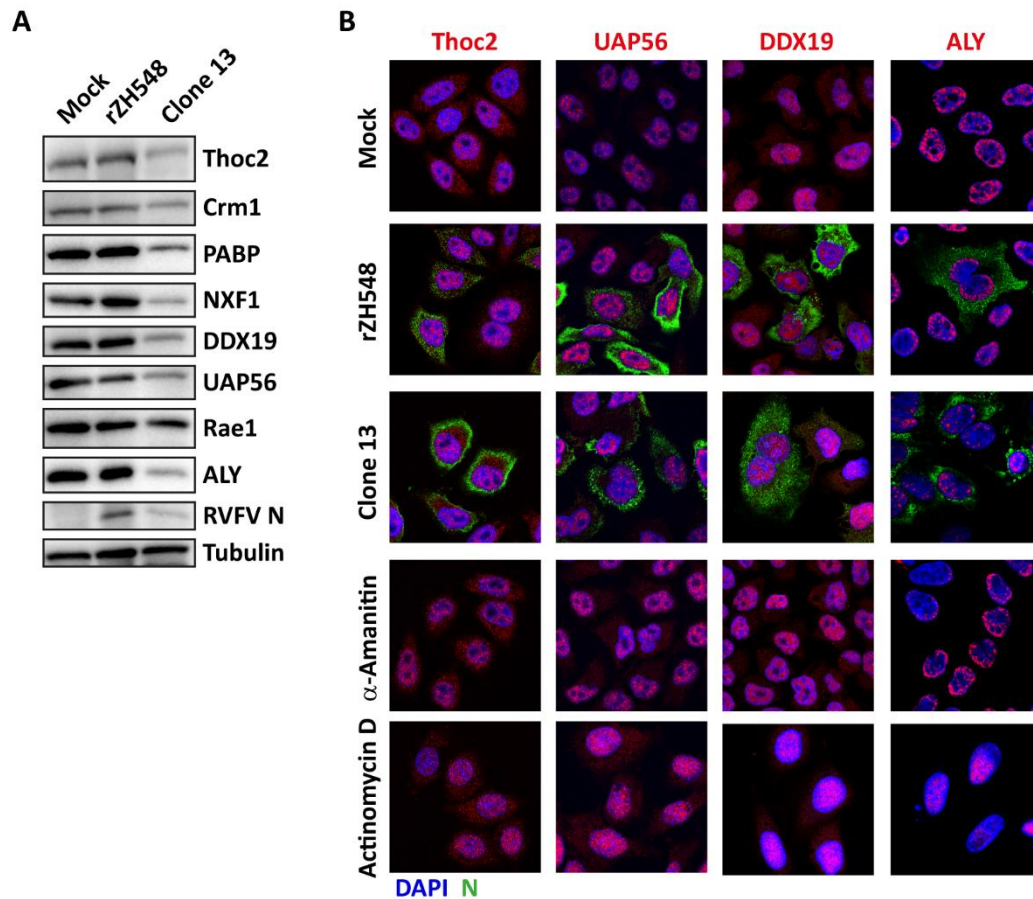


Abbildung 11 Status wichtiger mRNA-Exportfaktoren nach einer RVFV-Infektion für 24 h. **(A)** Western Blot-Analyse von HeLa-Zellen die mit rZH548 und Clone 13 mit einer MOI von 5 infiziert wurden. **(B)** KLSM-Aufnahmen zur Bestimmung der Lokalisation: HeLa-Zellen wurden mit rZH548 und Clone 13 mit einer MOI von 3 infiziert. Zudem wurden Zellen mit 10 $\mu\text{g/ml}$ α -Amanitin und 10 $\mu\text{g/ml}$ Actinomycin D behandelt. Anschließend erfolgte eine Fixierung und Immunfluoreszenzfärbung gegen die Exportfaktoren Thoc2, UAP56, DDX19 und ALY sowie gegen RVFV N.

Der Western Blot in Abbildung 11 A zeigt, dass alle Faktoren unter allen Bedingungen die gleichen Expressionslevel aufweisen. Daher scheinen keine dieser Faktoren stärker induziert oder abgebaut zu werden. Die Immunfluoreszenzaufnahmen in Abbildung 11 B bestätigen für Thoc2, UAP56, DDX19 oder ALY, dass sich die Lokalisierung nicht verändert. Anders verhält es sich hingegen bei den untersuchten Faktoren in Abbildung 12.

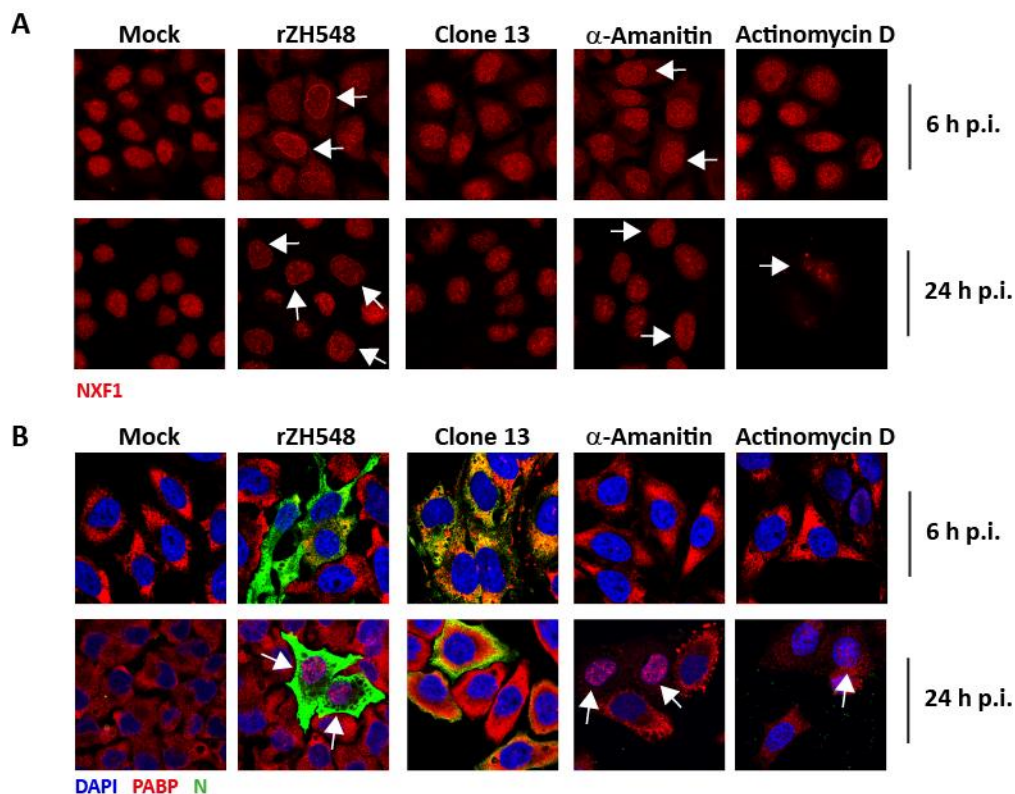


Abbildung 12 Immunfluoreszenz-Aufnahmen um den Status von NXF1 und PABP nach einer RVFV-Infektion zu bestimmen. HeLa-Zellen wurden mit rZH548 und Clone 13 für 6 h und 24 h mit einer MOI von 3 infiziert. Zusätzlich wurden Zellen mit 10 µg/ml α-Amanitin und 10 µg/ml Actinomycin D behandelt. Nach der Fixierung erfolgte eine Immunfluoreszenzfärbung gegen (A) NXF1 und gegen (B) PABP, RVFV N und DAPI.

Hier zeigt sich, dass sowohl NXF1 als auch PABP von einer RVFV-Infektion beeinflusst werden. So ist bei NXF1 bereits nach 6 h p.i. ein verstärktes Signal um den Zellkern herum zu erkennen. Dies kann allerdings auch in Zellen beobachtet werden, die mit dem Transkriptionsinhibitor α-Amanitin behandelt wurden, wobei dieser Effekt im Vergleich zu rZH548-infizierten Zellen wesentlich schwächer ausfällt. Das PABP hat normalerweise eine zytoplasmatische Lokalisation. Diese verlagert sich allerdings nach 24 h p. i. mit rZH548 in den Zellkern (siehe Abbildung 12 B). Vergleichbares ist zu erkennen, wenn die Zellen für 24 h mit den Transkriptionsinhibitoren α-Amanitin und Actinomycin D behandelt wurden. Hier handelt es sich um einen sekundären Effekt: Das PABP besitzt eine NLS, die normalerweise von gebundener mRNA maskiert wird, was zur Folge hat, dass es nicht über den Importin-α/β-Weg in den Zellkern transportiert werden kann (112). Sowohl die RVFV-Infektion als auch Behandlung mit den Transkriptionsinhibitoren führen zu einer Retention von mRNA im Zellern, sodass die NLS nun freiliegt und das PABP folglich in den Zellkern transportiert wird.

Diese Daten lassen den Schluss zu, dass RVFV-NSs nur auf NXF1 einen direkten Effekt hat und NXF1 womöglich eine Rolle in dem durch NSs induzierten mRNA-Exportblock

spielt. Die Bindung des Exportrezeptors NXF1 ermöglicht das Andocken der mRNA-Export-Komplexe an den NPC und dies scheint durch die Transkriptions-Inhibition durch NSs nur mäßig beeinflusst zu sein. Da ein Transkriptionsblock erst sehr spät zu einem mRNA-Exportblock führt (vgl. Kapitel 7.1), scheint dies nicht der komplette Mechanismus zu sein, durch den das RVFV-NSs die mRNA im Zellkern zurückhält. Allerdings konnte gezeigt werden, dass NSs spezifisch eine Umverteilung und möglicherweise eine Blockade des mRNA-Exportrezeptors verursacht.

7.3.1 Bedeutung von NXF1 für eine RVFV-Infektion

Um zu analysieren, ob NXF1 für den Replikationszyklus von RVFV von Bedeutung ist, wurde ein NXF1 *knock-down* durchgeführt. Anschließend folgte eine Infektion mit rZH548 und Clone 13 für 6 h und 24 h. Für die Bestimmung, ob ein Mangel an NXF1 einen Einfluss auf die Interferon-Induktion hat, wurden 6 h p.i. (MOI=10) RNA isoliert und eine qRT-PCR durchgeführt. Zusätzlich wurden 24 h p.i. (MOI=0,1) Überstände genommen um die Virus-Titer mittels Plaque Assay zu bestimmen.

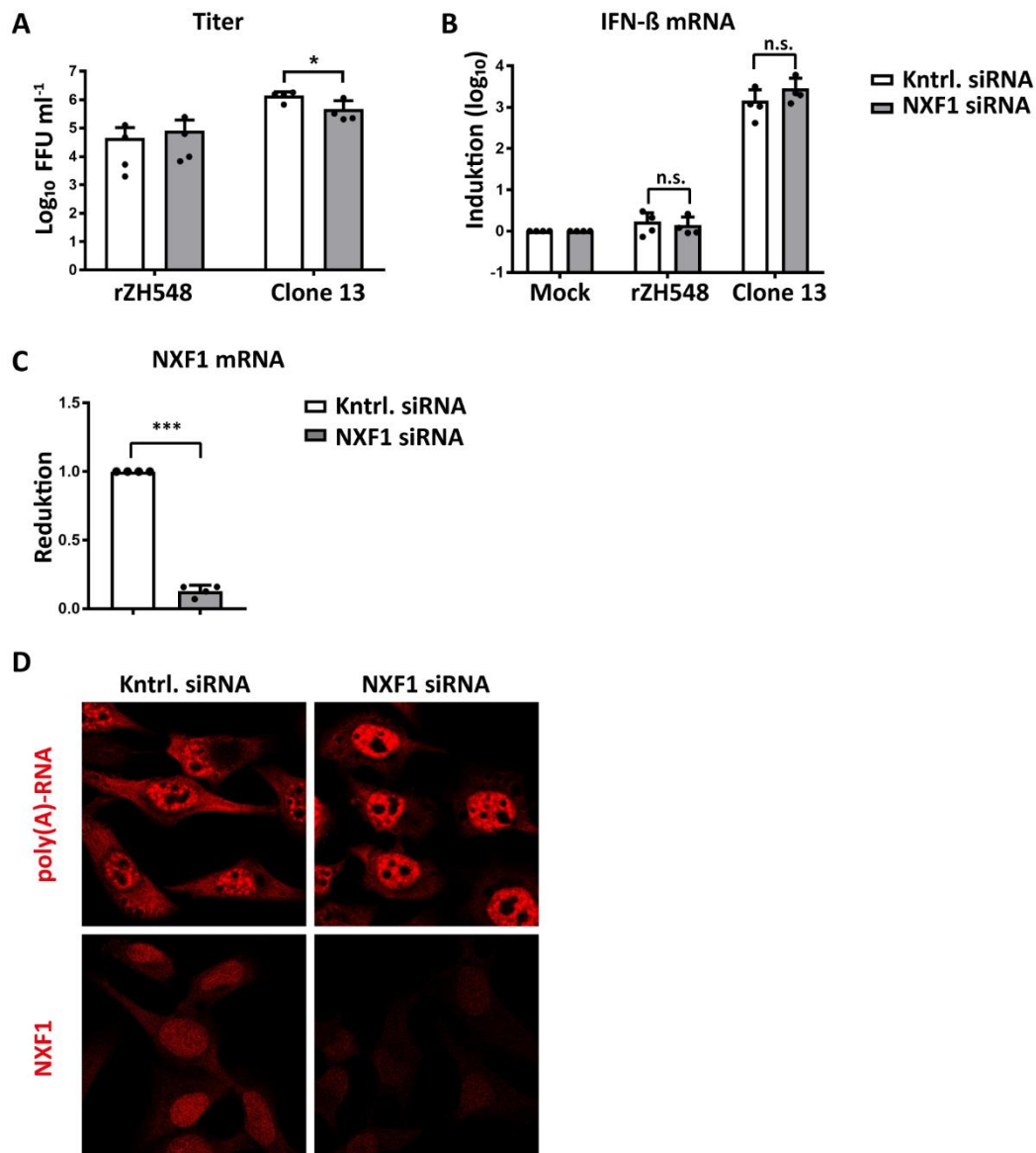


Abbildung 13 Einfluss eines NXF1 *knock-downs* auf eine RVFV-Infektion und poly(A)-RNA-Lokalisation. **(A)** Plaque Assay zur Bestimmung der Virus-Titer: HeLa-Zellen wurden mit Kontroll siRNAs und siRNAs gegen NXF1 transfiziert und 24 h später mit rZH548 und Clone 13 mit einer MOI von 0,1 infiziert. Der Zellüberstand wurde 24 h später zur Bestimmung der Titer abgenommen. **(B)** qRT-PCR zur Bestimmung der IFN-β und **(C)** NXF1 mRNA: HeLa-Zellen wurden mit Kontroll siRNA und siRNAs gegen NXF1 transfiziert und 24 h später mit rZH548 und Clone 13 mit einer MOI von 10 für 6 h infiziert. Danach erfolgte die Bestimmung der IFN-β-Induktion sowie der NXF1 mRNA mittels qRT-PCR. Die statistische Signifikanz wurde mittels gepaartem, zweiteitigen Student's t-Test ermittelt (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$). **(D)** KLSM-Aufnahmen der poly(A)-RNA-Verteilung sowie von NXF1 von Zellen die 24 h mit siRNA gegen NXF1 transfiziert wurden.

Die Ergebnisse der qRT-PCR in Abbildung 13 demonstrieren, dass ein Fehlen von NXF1 keinen Einfluss auf die NSs-vermittelte IFN-Suppression hat. Dahingegen zeigt sich für den NSs-deletierten Stamm Clone 13, dass geringfügig mehr IFN-β nachgewiesen werden kann. Entsprechend können bezüglich der Titer bei einer rZH548-Infektion ebenfalls keine Unterschiede zwischen Kontroll-Zellen und NXF1-depletierten Zellen

detektiert werden. Für Clone 13 wird ein geringerer Titer nachgewiesen, wenn NXF1 fehlt. Die geringeren Titer können aber mit der erhöhten IFN-Induktion bei NXF1-depletierten Zellen erklärt werden. Diese Beobachtung war entgegen der Erwartungen, da davon ausgegangen wurde, dass ein NXF1-*knock-down* einen mRNA-Exportblock induziert. Dieser führt dazu, dass weniger zelluläre Transkripte für die Translationsmaschinerie zur Verfügung stehen. Demnach wäre zu erwarten gewesen, dass die Titer wenigstens bei Clone 13 ansteigen, wenn NXF1 depletiert wird, da auch Transkripte von ISGs zurückgehalten werden können. Um sicherzugehen, dass tatsächlich ein NXF1-*knock-down* vorliegt wurden, parallel zu der Bestimmung der Titer und IFN-Induktion, die Level der NXF1 mRNA ermittelt. Zusätzlich wurde auch eine Oligo(dT) *in situ* Hybridisierung und eine Immunfluoreszenzfärbung gegen NXF1 durchgeführt. Dies soll verifizieren, ob in dem hier verwendeten System ein NXF1-*knock-down* vorliegt und ob dies eine Retention von poly(A)-RNA induziert. Der NXF1-*knock-down* war erfolgreich, da sowohl NXF1 mRNA (Abbildung 13 C) als auch das Protein selbst (Abbildung 13 D) durch die siRNA-Transfektion stark reduziert wurde. Die Bestimmung der Lokalisierung der poly(A)-RNA ergab, dass eine NXF1-Depletion tatsächlich zu einer Retention der poly(A)-RNA führt, dennoch kann noch ein leichtes Signal der poly(A)-RNA im Zytoplasma detektiert werden (Abbildung 13 D).

7.4 Die Kernpore als Angriffspunkt für das RVFV-NSs

Die FG-Nups dienen als Bindungsstellen für die nuklearen Transportrezeptoren (NTRs), wobei diese Interaktion entscheidend für die Rekrutierung an den *NPC* und somit den mRNA-Export ist (6, 120). Des Weiteren wurden Änderungen im mRNA-Export mit posttranslationalen Modifikationen von Nups oder Änderungen der *NPC*-Zusammensetzung in Verbindung gebracht (116). Im folgenden Kapitel wird geklärt, ob dies auch im Falle einer RVFV-Infektion zutreffend ist.

7.4.1 Das RVFV NSs verlagert Bestandteile der Kernpore in das Zytoplasma

Um zu ermitteln ob der *NPC* durch eine RVFV-Infektion beeinträchtigt ist, wurden HeLa-Zellen infiziert und mittels Western Blot und Immunfluoreszenzfärbung analysiert (Abbildung 14 und Abbildung 15).

Für die Western Blot-Analyse wurden HeLa-Zellen mit einer MOI von 5 infiziert und nach 24 h p. i. lysiert und anschließend analysiert. Da der *NPC* aus ca. 30 verschiedenen Proteinen besteht (39) konzentriert sich dieses Experiment auf die FG-haltigen Nups. Als Stellvertreter für Nups die keine FG-Wiederholungen besitzen, wurde Nup88 verwendet. Durch Western Blot-Analyse von Nup358, Nup214, Nup153, Nup98, Nup88 und Nup62 (Abbildung 14 A) mit nachfolgender Quantifizierung der Signale (Abbildung 14 B) zeigt dieses Experiment, dass eine RVFV-Infektion die Level der FG-Nups nicht verändert. Allerdings wird von Nup88 eine Reduktion in rZH548-infizierten Zellen nachgewiesen. Zwar ist auch eine Reduktion mit Clone 13 zu sehen, allerdings ist diese statistisch nicht signifikant (Student's t-Test: $p=0,49$; * $p<0,05$). Eine Reduktion von Nup88 nach 6 h p. i. konnte nicht nachgewiesen werden (Abbildung 14 C).

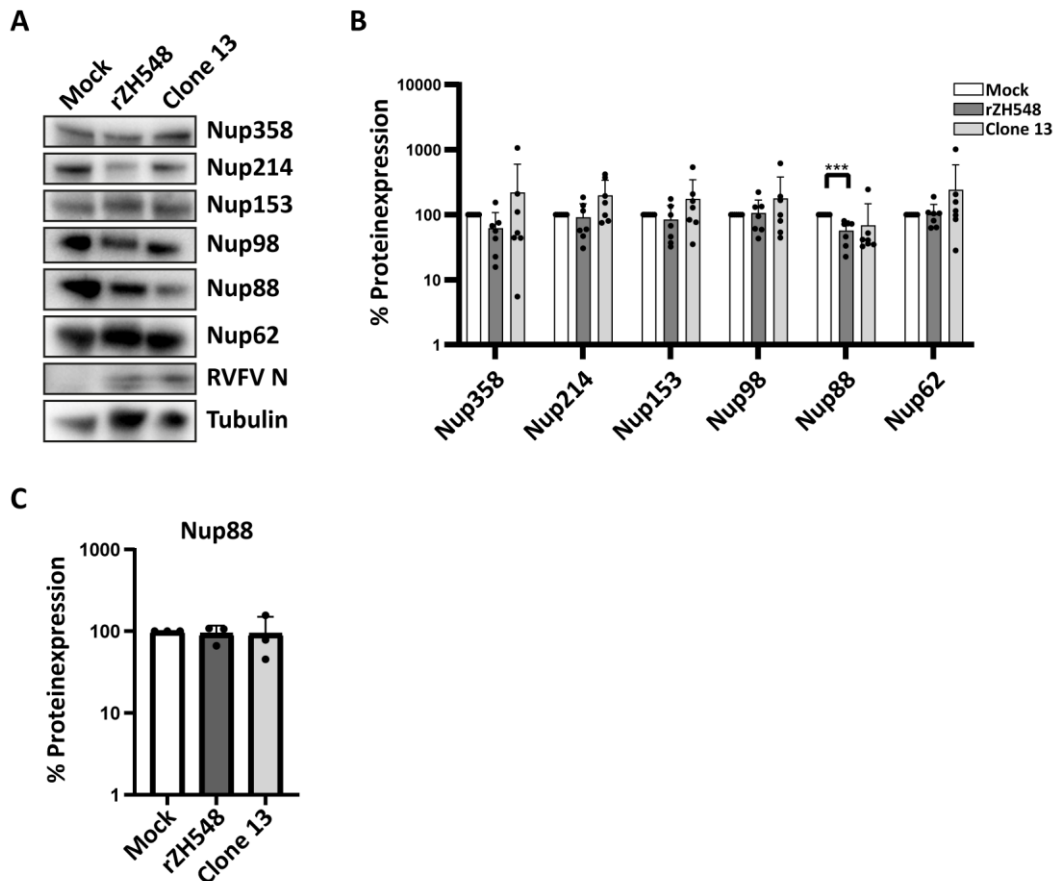


Abbildung 14 Status der Nukleoporine nach einer RVFV-Infektion. HeLa-Zellen wurden mit einer MOI von 5 für 24 h mit rZH548 und Clone 13 infiziert. **(A)** Anschließend erfolgte die Lyse der Zellen und mittels Western Blot wurden die Level Nups bestimmt. **(B)** Desweiteren wurden die in (A) gezeigten Signale aus sieben unabhängigen Experimenten, normalisiert gegen Tubulin, quantifiziert. **(C)** Quantifizierung der Nup88-Level 6 h p.i. Die statistische Signifikanz wurde mittels zweiseitigem, gepaarten Student's t-Test ermittelt ($p=0,003$; *** $p<0,005$).

Für die Immunfluoreszenz-Analyse wurden HeLa-Zellen für 6 h infiziert und anschließend fixiert. Für die NPC-Färbung wurde ein Antikörper verwendet, der die FG-Anteile der Nups erkennt. KLSM-Aufnahmen in Abbildung 15 A zeigen, dass bereits 6 h p. i. die RVFV-Infektion einen Einfluss auf den NPC hat. Anstatt eines gleichmäßigen Signals um den Zellkern herum, wie z.B. bei Mock oder Clone 13 zu sehen, bilden sich Aggregate sowohl am NPC als auch im Zytoplasma. Um auszuschließen, dass diese Beobachtung auf eine induzierte Apoptose zurückzuführen ist, wurden die Zellen mit dem pan-Caspase-Inhibitor Carbobenzoxy-Valyl-Alanyl-Aspartyl-[O-Methyl]-Fluoromethylketon (Z-VAD-fmk) 1 h vor der Infektion vorbehandelt und auch während den 6 h der Infektion dem Medium hinzugefügt. Wie in den KLSM-Aufnahmen in Abbildung 15 B zu sehen, zeigt sich weiterhin die Relokalisation und Formation der FG-Nups-Aggregate bei einer RVFV-Infektion.

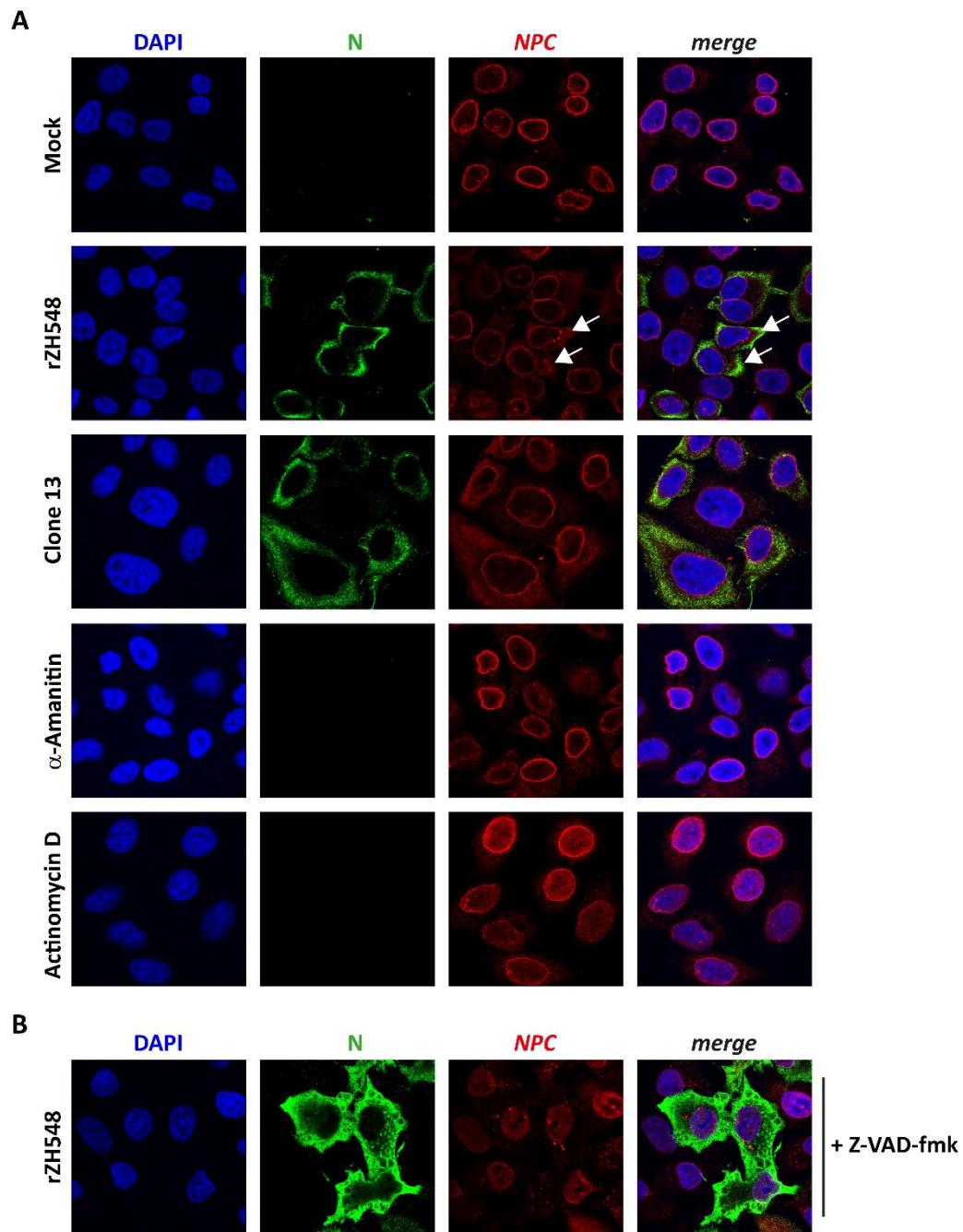


Abbildung 15 Kernporenfärbung infizierter HeLa-Zellen. **(A)** Nach einer Infektion mit rZH548 und Clone 13 sowie Behandlung mit 10 μ g/ml α -Amanitin und 10 μ g/ml Actinomycin D für 6 h wurden die Zellen fixiert und gegen RVFV N, DAPI und gegen den NPC gefärbt. **(B)** HeLa-Zellen wurden für 1 h mit 50 μ M Z-VAD-fmk vorbehandelt dann mit einer MOI von 3 für 6 h mit rZH548 in Anwesenheit von Z-VAD-fmk infiziert. Die Zellen wurden anschließend fixiert und gegen RVFV N, DAPI und NPC gefärbt.

Um weiterhin auszuschließen, dass es sich hierbei um einen sekundären Effekt handelt und eine RVFV-Infektion lediglich die Integrität des Zellkerns zerstört, wurde parallel zu den Versuchen aus Abbildung 15 der Status der Lamina untersucht.

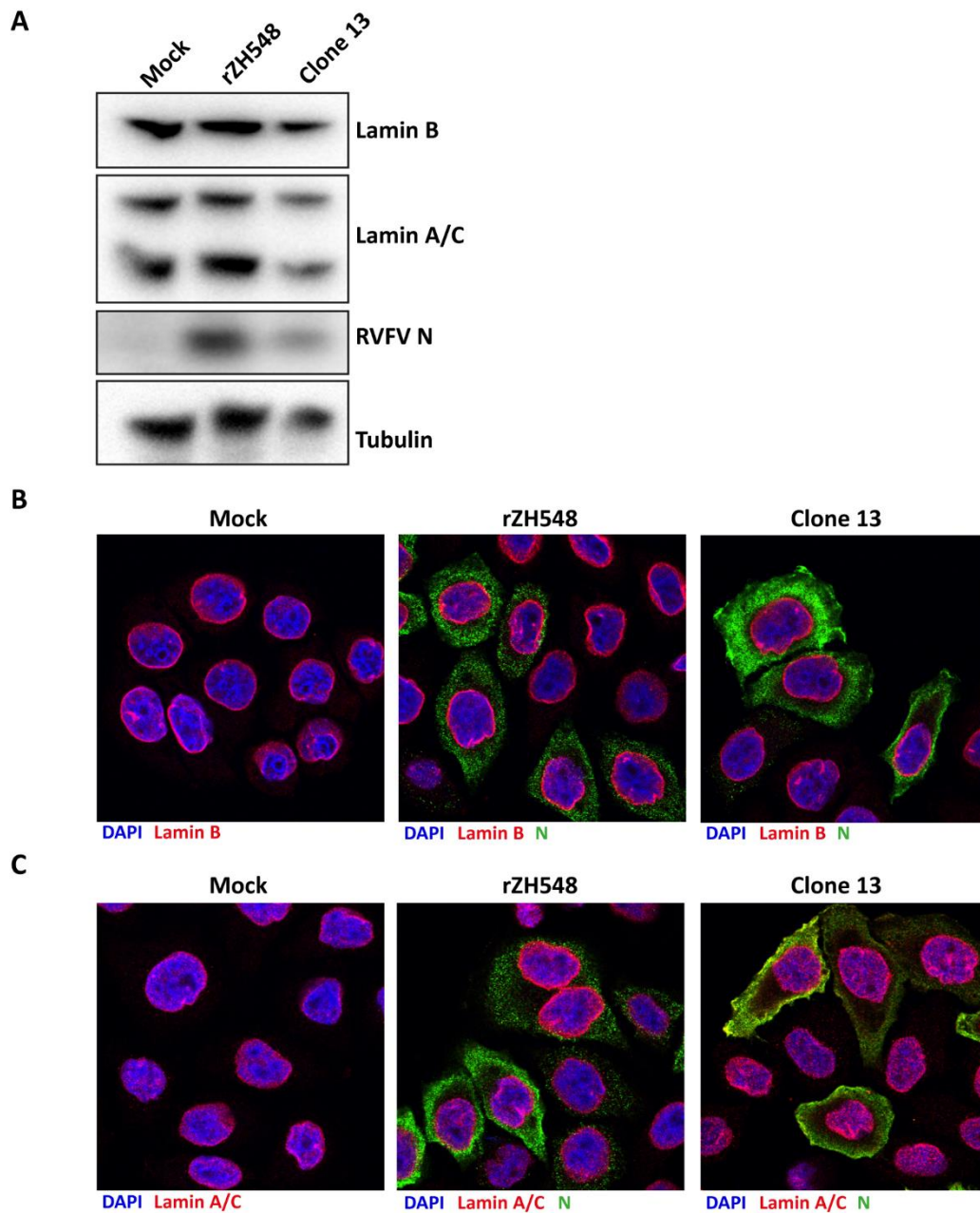


Abbildung 16 Status der Lamina nach einer RVFV-Infektion **(A)** HeLa-Zellen wurden für 24 h mit rZH548 und Clone 13 mit einer MOI von 5 infiziert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und mittels Western Blot wurden die Level von Lamin B, Lamin A/C, RVFV N und Tubulin bestimmt. **(B)** HeLa-Zellen wurden mit rZH548 und Clone 13 mit einer MOI von 3 für 24 h infiziert. Nach der Fixierung erfolgte eine Immunfluoreszenz-Färbung gegen Lamin B und RVFV N. **(C)** HeLa-Zellen wurden mit rZH548 und Clone 13 mit einer MOI von 3 für 24 h infiziert. Nach der Fixierung erfolgte eine Immunfluoreszenz-Färbung gegen Lamin A/C und RVFV N.

Sowohl Western Blot als auch Immunfluoreszenzanalysen zeigen in Abbildung 16, dass weder Lamin B noch Lamin A/C verändert sind und folglich die Integrität des Zellkerns nicht durch eine Virusinfektion herabgesetzt wird.

7.4.2 RVFV NSs re-lokalisiert Nup214 und Nup358

Die Immunfluoreszenzanalysen in Kapitel 7.4.1 zeigen, dass RVFV-NSs FG-Nups in das Zytoplasma verlagert. Da allerdings ein Antikörper verwendet wurde, der nur die FG-Anteile der Nups erkennt, kann bisher keine Aussage darüber getroffen werden, ob nur ein oder mehrere Nups betroffen sind oder ob es sich bei den Aggregaten um Poren-Komplexe der Annulate Lammellae (AL) handelt. Bei AL handelt es sich um zytoplasmatische Organelle, die aus parallelen Membranen bestehen, die einen Hohlraum oder eine Zisterne umschließen (106). Sie sind häufig Fortsetzungen des Membranen-Netzwerks des ERs. AL sind häufig in Zellen mit hoher proliferativer Kapazität, wie Tumorzellen oder embryonalen Zellen, oder auch in nicht-proliferierenden-Zellen mit permanenten Zellzyklus-Arrest zu finden (106). Es ist zwar bekannt, dass manche Viren die Bildung von AL induzieren können, allerdings ist der Zusammenhang zwischen Ursache und Wirkung noch unklar (106). Die Poren-Komplexe der Annulate Lamellae (ALPCs) sind ähnlich aufgebaut wie die NPCs. Die ALPCs besitzen ebenfalls Nup358, Nup214, Nup153, Nup98, Nup88 und Nup62. Allerdings fehlen ihnen im Vergleich zu den NPCs die Faktoren Tpr, ELYS und POM121 (169). Um zu beantworten, ob es sich bei den beobachteten Aggregaten um ALPCs oder um einzelne, spezifische Nups handelt, wurden HeLa-Zellen für 6 h und 24 h infiziert und nach der Fixierung mit Antikörpern gefärbt die gezielt gegen Nup358, Nup214, Nup153, Nup98, Nup88 und Nup62 gerichtet sind.

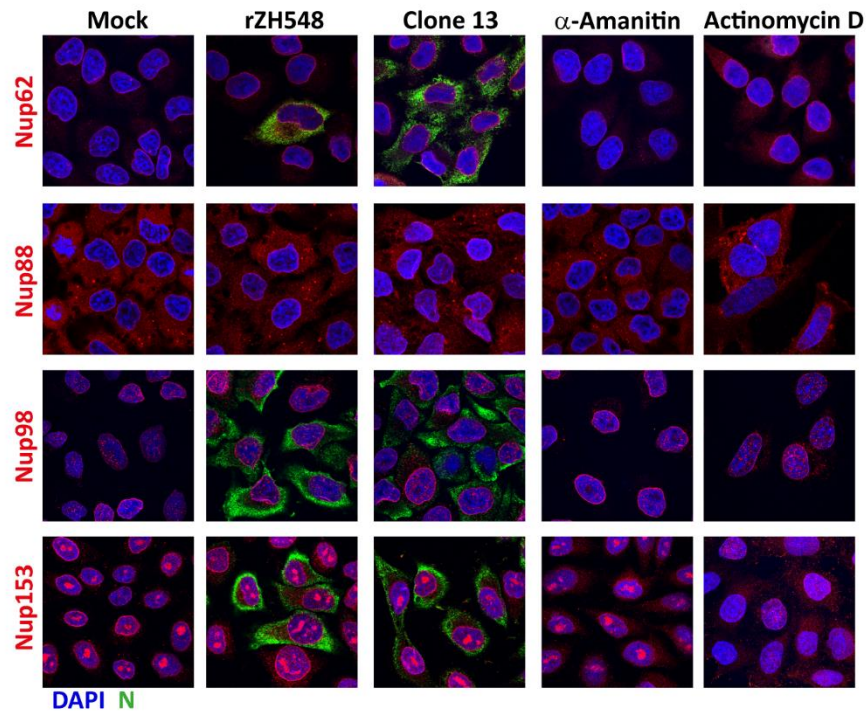


Abbildung 17 KLSM-Aufnahmen zur Ermittlung des Status von Nup62, Nup88, Nup98 und Nup153 nach einer RVFV Infektion. HeLa-Zellen wurden mit einer MOI von 3 für 6 h infiziert bzw. mit 10 $\mu\text{g/ml}$ α -Amanitin und 10 $\mu\text{g/ml}$ Actinomycin D behandelt und anschließend fixiert. Es erfolgte eine Färbung gegen die Nups sowie RVFV N.

Nach 6 h p. i. ist kein Effekt von RVFV auf Nup62, Nup88, Nup98 und Nup153 zu sehen (Abbildung 17). Eine Behandlung mit Actinomycin D führt lediglich zu einem Signalverlust von Nup153 im Zellkern.

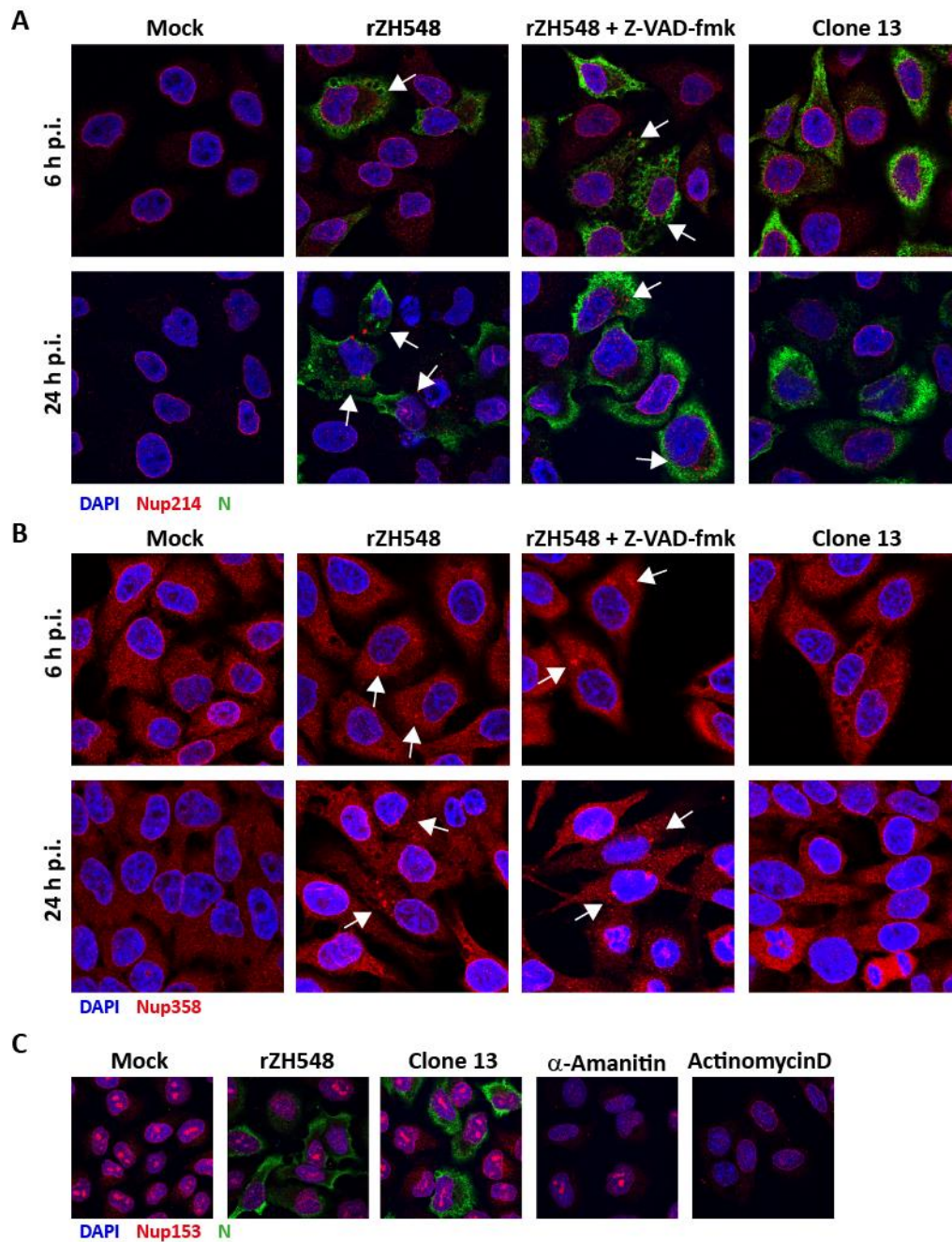


Abbildung 18 Immunfluoreszenzanalysen spezifischer Nups nach einer RVFV-Infektion. HeLa-Zellen wurden mit rZH548 und Clone 13 mit einer MOI von 3 für 6 h und 24 h infiziert. Parallel erfolgte dies in der Anwesenheit von 50 μ M Z-VAD-fmk. Nach der Fixierung erfolgte eine Antikörper-Färbung gegen **(A)** Nup214 und RVFV N bzw. **(B)** Nup358 und RVFV N. **(C)** HeLa-Zellen wurden für 24 h mit rZH548 und Clone 13 mit einer MOI von 3 für 24 h infiziert oder mit 10 μ g/ml α -Amanitin bzw. 10 μ g/ml Actinomycin D behandelt. Nach der Fixierung erfolgte eine Antikörper-Färbung gegen Nup153 und RVFV N.

Bei sowohl Nup214 als auch Nup358 lässt sich nach 6 h p. i. eine Relokalisation in das Zytoplasma erkennen, wenn die Zellen mit dem wildtypischen RVFV infiziert wurden. Dies ist auch der Fall, wenn die Zellen mit Z-VAD-fmk behandelt wurden (siehe Abbildung 18 A und B). Allerdings scheint es sich bei der Relokalisation von Nup358 um einen sekundären Effekt zu handeln, da auch bei der Behandlung mit α -Amanitin und

Actinomycin D diese Umverteilung zu sehen ist. Ebenso zeigt sich nach 24 h p. i., dass das nukleäre Signal von Nup153 bei einer Infektion des wildtypischen RVFV verschwindet (siehe Abbildung 18 C). Da sich dies aber auch hier in den Zellen zeigt, die mit α -Amanitin und Actinomycin D behandelt wurden, bestätigt dies die Behauptung, dass es sich hierbei um einen sekundären Effekt handelt, der auf die Inhibition der Transkription durch NSs zurückzuführen ist.

Wenn eine RVFV-Infektion die Bildung von *ALPCs* induzieren würde, wären Nup358, Nup214, Nup153, Nup88 und Nup62 im Zytoplasma zu detektieren. Die Tatsache, dass nur Nup214 und Nup358 bei einer RVFV-Infektion im Zytoplasma nachzuweisen sind, weist darauf hin, dass es sich bei den Aggregaten aus Abbildung 15 nicht um *ALPCs* handelt. Das Nup214 und das Nup358 sind über Nup88 in der Kernpore verankert (12). Da die NSs-abhängige Reduktion von Nup88 erst spät in der Infektion erfolgt (Abbildung 14), scheint dies also nicht die Ursache der Umverteilung zu sein. Allerdings ist nicht auszuschließen, dass dies einen additiven Effekt auf die Relokalisation hat.

Mit allen vorherigen Analysen zeigt sich, dass eine RVFV-Infektion den *NPC* stört, allerdings geschieht dies nicht durch einen Abbau, sondern zum einen indirekt durch den vermittelten Transkriptionsblock (Nup153 und Nup358) und zum anderen spezifisch und unabhängig vom Transkriptionsblock (Nup214). Es kann zwar eine Reduktion von Nup88, das mit verschiedenen FG-Nups interagiert, detektiert werden, allerdings erst 24 h p. i.. Demnach kann die Aggregatbildung auch nicht durch einen Einfluss von RVFV NSs auf Nup88 erklärt werden.

7.4.3 Bedeutung von Nup214 für eine RVFV-Infektion

In Kapitel 7.4.2 wurde gezeigt, dass Nup214 spezifisch durch eine RVFV-Infektion Aggregate im Zytoplasma bildet. Darüber hinaus wurden auch Aggregate von Nup358 im Zytoplasma nachgewiesen. Allerdings handelt es sich hierbei vermutlich um einen sekundären Effekt. Aus diesem Grund wird im Folgenden nur die Relevanz von Nup214 für den Replikationszyklus von RVFV untersucht. Hierfür wurde zunächst ein *knock-down* von Nup214 durchgeführt und dann mit rZH548 oder Clone 13 infiziert. Anschließend wurden zum einen die Überstände für eine Virus-Titration genommen (Abbildung 19 A) und zum anderen die RNA für qRT-PCR isoliert, um die IFN- β -Induktion zu bestimmen (Abbildung 19 B).

In der Abwesenheit von Nup214 fällt der Titer von rZH548 ab. Überraschenderweise wurde der Titer des NSs-deletierten Stammes ebenfalls reduziert, auch wenn die Korrelation nicht signifikant ist (Student's t-Test: $p=0,41$; * $p<0,05$). Demnach wird Nup214 von rZH548 und Clone 13 möglicherweise für eine allgemeine Funktion bei der

Virusreplikation benötigt. Darüber hinaus führt eine Nup214-Depletion zu keiner IFN-Induktion durch WT-RVFPV. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass die IFN-Induktion durch einen allgemeinen Defekt beim Kernimport von Transkriptionsfaktoren für die IFN- β -Promoteraktivierung gedämpft wird. Diese Vermutung wird durch die Beobachtung unterstützt, dass die IFN-Induktion durch Clone 13 verringert wird, wenn Nup214 fehlt, obwohl auch hier keine statistische Signifikanz (zweiseitiger, gepaarter Student's t-Test: $p=0,42$; * $p<0,05$) erreicht wird. Allerdings kann dies auch durch den verringerten Titer erklärt werden.

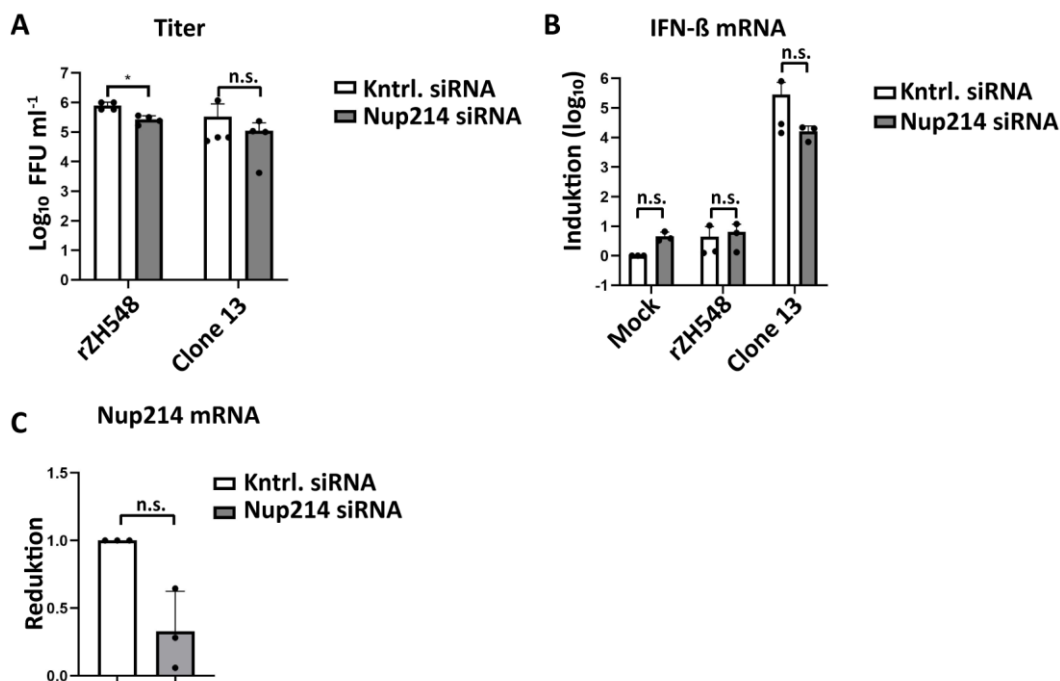


Abbildung 19 Bedeutung von Nup214 für eine RVFPV-Infektion. HeLa-Zellen wurden mit siRNAs gegen Nup214 transfiziert und 72 h später mit rZH548 und Clone 13 mit einer MOI von 10 infiziert. Anschließend erfolgte **(A)** 24 h p.i. die Bestimmung der Virus Titer mittels Immunofocus-Assay und **(B)** 6 h p.i. die IFN- β -Induktion mittels RT-qPCR. **(C)** Bestimmung der *knock-down*-Effizienz mittels qRT-PCR. Die statistische Signifikanz wurde mittels zweiseitigem, gepaarten Student's t-Test ermittelt (* $p<0,05$).

7.4.4 NSs Phänotypisierung

Um den Zusammenhang zwischen der NSs-induzierten Verlagerung von Nup214 in das Zytoplasma, der Abhängigkeit von Nup98 und Rae1 für eine bessere RVFPV-Replikation und dem durch NSs verursachten mRNA-Exportblock besser verstehen zu können, wurden weiterführende *knock-down*-Experimente durchgeführt. Hierzu wurden Zellen mit siRNAs gegen Rae1, NXF1, Nup98, und Nup214 transfiziert. Mittels Immunfluoreszenzanalyse wurde der Einfluss des *knock-downs* auf die mRNA-

Verteilung, die Nups sowie auf die mRNA-Exportfaktoren DDX19, NXF1 und ALY analysiert. Als Kontrolle wurde ein Nup62-*knock-down* durchgeführt, da sich Nup62 bei RVFV-Infektion nicht verändert. Diese Daten wurden dann mit den bereits gesammelten Immunfluoreszenz-Ergebnissen von NSs verglichen. Zusätzlich wurden die Ergebnisse im Zusammenhang mit den Transkriptionsinhibitoren α -Amanitin und Actinomycin D berücksichtigt, um zu sehen, welcher Effekt auf den durch NSs-induzierten Transkriptionsblock zurückzuführen ist. In Tabelle 20 sind die Ergebnisse aus den jeweiligen Beobachtungen bei den Immunfluoreszenzen der entsprechenden Faktoren zusammen dargestellt (Immunfluoreszenzaufnahmen im Anhang; Abbildung 32 und Abbildung 33). Ein „+“ steht dabei für eine Umverteilung der Faktoren, wobei die Stärke der Umverteilung durch die Anzahl der „+“ repräsentiert wird. Ein „-“ steht dafür, dass kein Effekt zu beobachten ist.

Tabelle 20: Übersicht über die Faktoren, die durch RVFV NSs, *knock-down* oder Behandlung mit Transkriptions-Inhibitoren relokalisiert werden.

	<i>Knock-down/Inhibitor</i>							
Faktor	NSs	Rae1	Nup98	Nup214	Nup62	NXF1	α-Amanitin	Act D
poly(A)-RNA	+++	+	++	+	-	++	+	+
NPC	+	-	+	+	+	-	-	-
Nup98	-	-		-	+	-	-	-
Nup214	+	-	+		+	-	-	-
Nup62	-	-	+	-		-	-	-
Nup88	-	-	+	+	+	-	-	-
Nup153	+	-	+	-	-	-	-	+
Nup358	+	-	+	+	+	-	-	+
DDX19	-	-	-	+	+	-	-	-
NXF1	+	+	-	-	+		+	-
ALY	-	-	-	-	-	-	-	+

+ = Umverteilung, ++ = starke Umverteilung, +++ = sehr starke Umverteilung; - = keine Umverteilung

Die bisherigen Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass RVFV-NSs eine Retention von poly(A)-RNA (Abbildung 6) sowie eine Aggregatbildung und Relokalisation von FG-Nups

(Abbildung 15) hervorruft. Die betroffenen FG-Nups sind Nup214, Nup358 und Nup153 (Abbildung 18). Durch eine Behandlung mit den Transkriptionseinhibitoren zeigen die Ergebnisse allerdings, dass nur Nup214 direkt von NSs betroffen ist und der Effekt auf Nup358 und Nup153 hingegen auf den NSs-induzierten Transkriptionsblock zurückzuführen ist (Abbildung 18). Western-Blot-Analysen zeigen ebenfalls, dass das Nup88 spät in der Infektion durch RVFV NSs reduziert wird (Abbildung 14). Bezüglich der mRNA-Exportfaktoren hat NSs einzig einen Effekt auf NXF1 (Abbildung 12).

Gemäß den neuen Ergebnissen hat eine Depletion von Rae1 durch RNA-Interferenz keinen Einfluss auf die Kernporen, allerdings führt ein *knock-down* zu einem mRNA-Exportblock und das NXF1-Signal verringert sich. Zusätzlich zeigt sich eine leichte Akkumulation von NXF1 an der Kernmembran, ähnlich wie bei RVFV-infizierten Zellen. Zudem zeigt der hier durchgeführte NXF1 *knock-down*, dass dies zu einer starken Retention der poly(A)-RNA im Zellkern führt. Folglich zeigen die neuen Erkenntnisse, dass eine Beeinträchtigung von NXF1, entweder direkt durch NSs oder indirekt durch die Beeinträchtigung von Rae1, den mRNA-Exportblock erklären könnten.

Der hier durchgeführte Nup98-*knock-down* führt zu einer Retention der poly(A)-RNA und induziert eine Aggregatbildung und Relokalisation aller FG-Nups und Nup88. Ein Nup62-*knock-down* hat keinen Einfluss auf die Verteilung der poly(A)-mRNA, allerdings werden Nup98, Nup214, Nup88, Nup358 und DDX19 relokalisiert. Zudem verringert sich das NXF1-Signal in den Nup62-*knock-down*-Zellen. Da sich Nup62, ebenso wie Nup98, im Zentralkanal des NPCs befindet, sich die *knock-down*-Effekte allerdings voneinander unterscheiden, scheinen diese Effekte spezifisch für diese Nups und nicht für Lage innerhalb des NPCs zu sein. Entsprechend der neuen Erkenntnisse aus den *knock-down*-Experimenten kann eine Beeinträchtigung von Nup98 durch NSs den mRNA-Exportblock erklären. Allerdings ist nicht eindeutig ob dies auch die Aggregatbildung spezifisch von Nup214 und Nup358 erklärt, da der Nup98-*knock-down* alle untersuchten Nups umverteilt.

Das RVFV-NSs verlagert Nup214 in das Zytoplasma (Abbildung 18). Hier zeigt sich nun in Zellen ohne Nup214, wie bei RVFV-NSs, die Umverteilung von poly(A)-RNA vom Zytoplasma in den Zellkern. Ebenso kommt es zu Aggregatbildung und Umverteilungen von Nup358 und Nup88 in das Zytoplasma und zu einer Verringerung des Signals von DDX19. Der Vergleich von RVFV-NSs mit der Nup214-Depletion zeigt, dass sie die gleichen Effekte auf die Kernpore haben, allerdings unterscheiden sie sich bei DDX19. Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass bei einem *knock-down* mehr Nup214 aus dem NPC depletiert wird als bei einer RVFV-Infektion. Die Beobachtungen bezüglich des Nup214 *knock-downs* stimmen mit bereits veröffentlichten Daten überein, bei dem sich das Nup214 in einem Sub-Komplex mit dem Nup88 befindet, der wiederum mit

Nup358 interagiert (12). Ebenso zeigt diese Veröffentlichung, dass ein Nup214 *knock-down* zu einer Kodepletion von Nup88 und Nup358 führt. So lässt sich aus den Ergebnissen dieser Arbeit vermuten, dass eine Umverteilung von Nup214 durch NSs die Reduktion von Nup88 zur Folge hat. Dies, in Kombination mit dem Transkriptionsblock durch NSs, führt dann zu einer Relokalisation von Nup358 in das Zytoplasma. Ebenso kann dies zu einem mRNA-Exportblock führen, da sowohl Nup214 als auch Nup358 essenziell für den erfolgreichen mRNA-Export sind.

7.5 Andere NSs-Proteine induzieren ebenfalls einen mRNA-Exportblock

Nachdem in Kapitel 7.1 gezeigt wurde, dass das RVFV einen mRNA-Exportblock induziert, stellt sich die Frage, ob dieser Mechanismus exklusiv für das RVFV-NSs ist, oder ob die Nichtstrukturproteine anderer *Bunyavirales* auch dazu in der Lage sind. Hierfür wurden HeLa-Zellen mit Plasmiden transfiziert, die für das NSs von Punta Toro Virus Adames (PTV-A; Familie: *Phenuiviridae*, Genus: *Phlebovirus*), Punta Toro Virus Balliet (PTV-B; Familie: *Phenuiviridae*, Genus: *Phlebovirus*), Sandfly fever Sicilian Virus (SFSV; Familie: *Phenuiviridae*, Genus: *Phlebovirus*), La Crosse-Enzephalitis Virus (LACV; Familie: *Peribunyaviridae*, Genus: *Orthobunyavirus*) und RVFV (Familie: *Phenuiviridae*, Genus: *Phlebovirus*) kodieren. Zur Visualisierung der mRNA-Verteilung wurde nach 16 h eine Oligo(dT) *in situ* Hybridisierung durchgeführt. Für alle untersuchten NSs-Proteine zeigt sich eine Veränderung der mRNA-Verteilung (Abbildung 20 A). Für PTV-A zeigt sich eine rein nukleäre Lokalisation der mRNA, wobei die mRNA nicht wie bei RVFV gleichmäßig verteilt ist, sondern punktförmige Aggregate ausbildet. Für PTV-B-NSs und SFSV-NSs zeigen sich neben einer gleichmäßigen nukleären Lokalisation der mRNA auch zytoplasmatische Aggregate. Für LACV-NSs ist eine rein nukleäre Verteilung der mRNA zu beobachten.

Da RVFV-NSs unter anderem den NPC beeinträchtigt, um den mRNA-Exportblock zu induzieren, wurde ebenso der Status des NPC in Anwesenheit der anderen NSs-Proteine untersucht. Hierfür wurden ebenfalls HeLa-Zellen mit den NSs-exprimierenden Plasmiden transfiziert und 16 h später die Immunfluoreszenzfärbungen gegen den NPC und NSs durchgeführt. Die KLSM-Aufnahmen in Abbildung 20 B zeigen, dass nur SFSV-NSs und LACV-NSs in der Lage sind, den NPC zu beeinflussen. Bei SFSV-NSs zeigen sich Aggregate am NPC selbst, wobei LACV-NSs dazu führt, dass das Signal um den Zellkern schwächer wird und sich das Signal im Zellkern verstärkt.

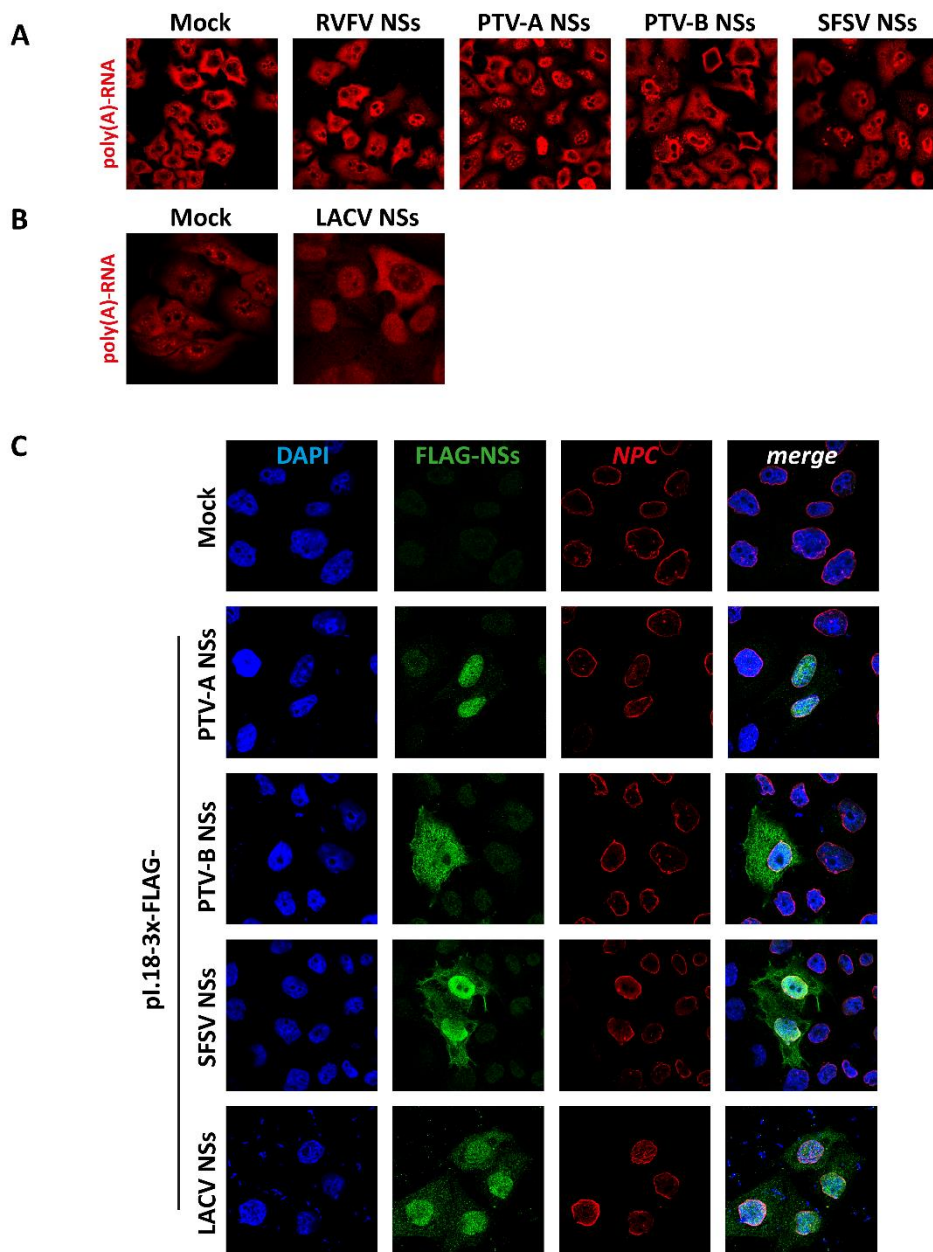


Abbildung 20 KLSM-Aufnahmen zum Nachweis der subzellulären Lokalisation der poly(A)-RNA in untransfizierten und NSs-transfizierten Zellen **(A)** HeLa-Zellen wurden mit pl.18-Plasmiden transfiziert, die für die NSs-Proteine von PTV-A, PTV-B, SFSV und **(B)** LACV kodieren. Nach 16 h wurde die Oligo (dT) *in situ* Hybridisierung zur Visualisierung der poly(A)-RNA durchgeführt. **(C)** HeLa-Zellen wurden wie in (A) transfiziert. Nach der Transfektion folgte ein Immunfluoreszenzfärbung gegen FLAG-NSs und den NPC.

7.5.1 LACV-NSs-unabhängige Induktion des mRNA Exportblocks

Der in Kapitel 7.5 beobachtete mRNA-Exportblock durch LACV-NSs soll im Folgenden durch eine Infektion verifiziert werden. HeLa-Zellen wurden dazu mit LACV, einem NSs-deletierten LACV Stamm (LACV Δ NSs) und mit RVFV MP-12 als Positivkontrolle jeweils mit einer MOI von 3 für 6 h infiziert und anschließend wurde eine Oligo(dT) *in situ*

Hybridisierung durchgeführt (Abbildung 21 A). Interessanterweise zeigte sich nicht nur bei LACV, sondern auch bei LACVdelNSs eine Retention der poly(A)-RNA im Zellkern, wobei dort zusätzlich noch poly(A)-RNA im Zytoplasma zu erkennen ist. Zusätzlich wurde der Status von PABP in infizierten Zellen mittels Immunfluoreszenz untersucht (Abbildung 21 B). Nach einer Infektion für 6 h und 24 h mit LACV und LACVdelNSs zeigte sich, dass nach 6 h nur LACV in der Lage ist, das PABP im Zellkern zurückzuhalten. Bei einer LACVdelNSs-Infektion verlagert sich das PABP erst nach 24 h in den Zellkern. Allein LACV-NSs ist folglich schon in der Lage, einen Exportblock zu induzieren. Allerdings scheint LACV zusätzlich einen NSs-unabhängigen Weg zu nutzen, um die mRNA im Zellkern zurückzuhalten.

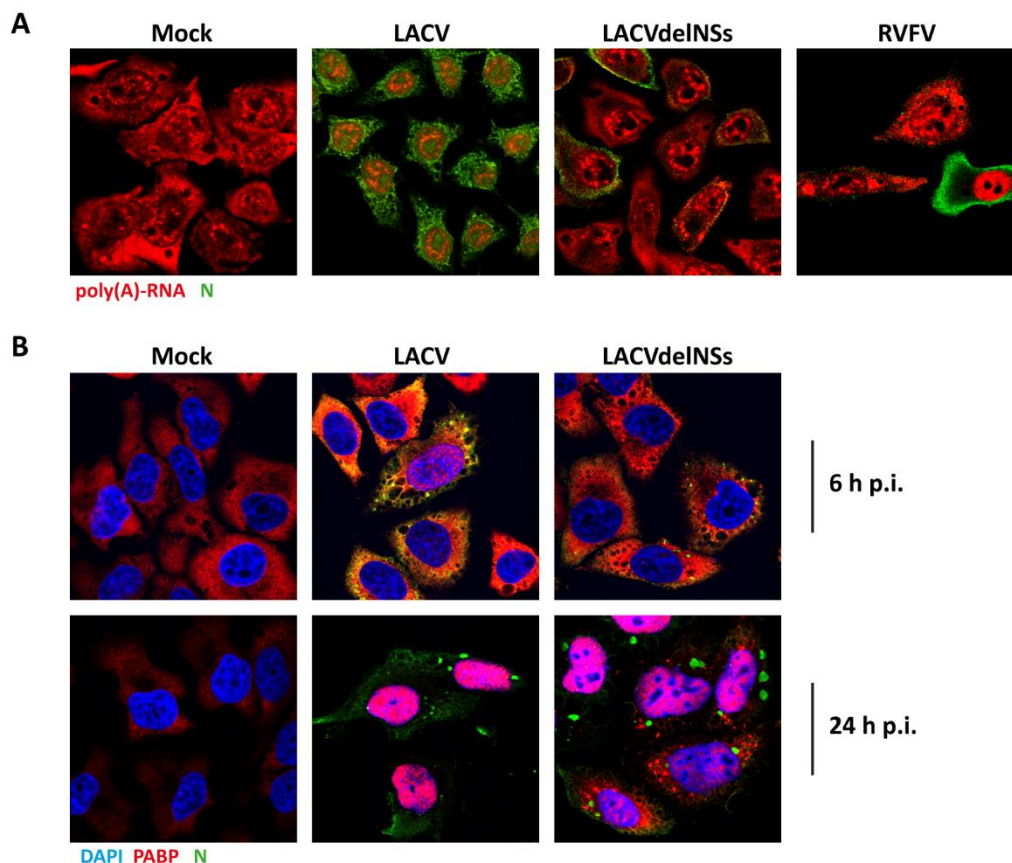


Abbildung 21 Immunfluoreszenzaufnahmen zur Verifizierung des LACV-induzierten mRNA Exportblocks. **(A)** HeLa-Zellen wurden mit LACV, LACVdelNSs und RVFV MP-12 mit einer MOI von 3 für 6 h infiziert. Anschließend erfolgte eine Oilgo(dT) *in situ* Hybridisierung, gefolgt von einer Immunfluoreszenzfärbung gegen LACV N und RVFV N. **(B)** HeLa-Zellen wurden für 6 h und 24 h mit LACV und LACVdelNSs mit einer MOI von 3 infiziert. Nach der Fixierung erfolgte eine Immunfluoreszenzfärbung gegen LACV N und PABP.

7.5.1.1 Verlust der *NPC*-Integrität durch LACV

Die Transfektionsexperimente in Kapitel 7.5 zeigen, dass LACV den *NPC* beeinflusst. Um herauszufinden, wie es zu dem veränderten Immunfluoreszenz-Signal des *NPCs* kommt, wurden HeLa-Zellen mit LACV und LACVdeINSs für 6 h und 24 h infiziert und mittels Western Blot wurde der Status der FG-Nups sowie der Lamine A/C und B bestimmt (Abbildung 22 A). Weder LACV noch LACVdeINSs scheinen die Level der FG-Nups zu verändern. Allerdings zeigt sich nach 24 h eine Reduktion des Signals von Lamin C bei beiden Viren. Zusätzlich zeigt sich, dass die Lamin B-Level durch beide Viren abnehmen und ein weiteres Signal auf Höhe von ca. 40 kDa erscheint.

Es ist bereits beschrieben, dass eine Induktion der Apoptose zu einer Spaltung der Lamine führt, wobei das Spaltprodukt von Lamin B ca. 43 kDa beträgt (107). Um sicherzustellen, dass die Apoptose in HeLa-Zellen ebenso zu einer Spaltung der Lamine führt, wurden HeLa-Zellen mit α -Amanitin, Actinomycin D, poly(I:C), CHX und Doxorubicin behandelt, um die Apoptose zu induzieren. Die Western Blot-Analysen in Abbildung 22 B zeigen, dass eine Behandlung mit α -Amanitin, CHX und Doxorubicin zu einem verringerten Signal von Lamin A/C führt. Ebenso zeigt sich bei Lamin B eine Reduktion durch die Behandlung mit α -Amanitin. Der Einsatz von Actinomycin D und poly(I:C) führt zu Spaltprodukten, wohingegen eine Behandlung mit CHX und Doxorubicin zu einem kompletten Verschwinden des Lamin B-Signals führt. Demnach resultiert eine Induktion der Apoptose in HeLa-Zellen ebenfalls zu einer Spaltung der Lamine.

Im Anschluss wurde untersucht, ob eine Hemmung der Apoptose durch den Caspase-Inhibitor Z-VAD-fmk die Spaltung der Lamine durch LACV verhindern kann. Die Zellen wurden hierfür eine Stunde vor der Infektion mit Z-VAD-fmk vorbehandelt und dann für 24 h in Anwesenheit des Inhibitors mit LACV und LACVdeINSs infiziert. Der Western Blot in Abbildung 22 C zeigt, dass sowohl bei LACV als auch bei LACVdeINSs die Spaltung der Lamine durch die Behandlung mit Z-VAD-fmk verhindert werden kann, ohne dass sich die Level von LACV N reduzieren. Demnach scheinen sowohl LACV als auch LACVdeINSs die Apoptose zu induzieren, was wiederum dazu führt, dass die strukturelle Integrität der Kernpore verschlechtert wird.

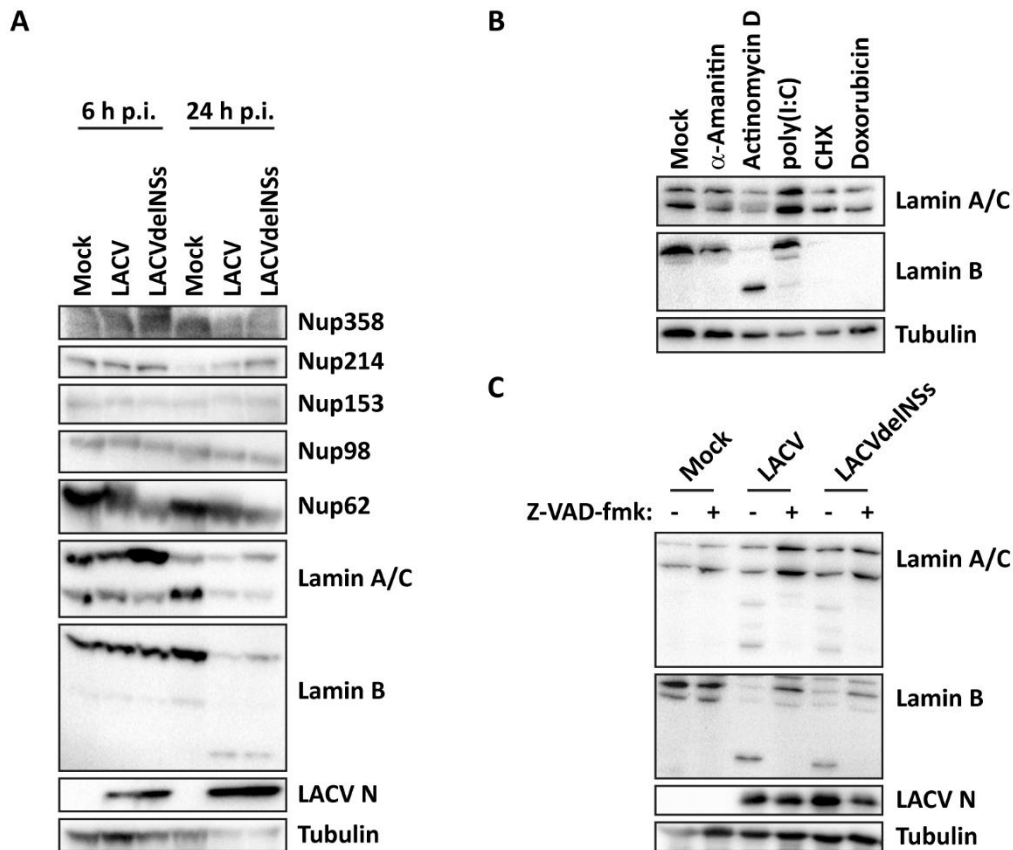


Abbildung 22 Western Blot-Analysen des NPCs sowie der Lamine **(A)** HeLa-Zellen wurden mit LACV und LACVdelINSs mit einer MOI von 5 für 6 h und 24 h infiziert. Anschließend erfolgte die Lyse der Zellen gefolgt von einem Western Blot, um den Status der Nups und Lamine zu analysieren. **(B)** HeLa-Zellen wurden für 6 h mit 10 μ g/ml α -Amanitin, 10 μ g/ml Actinomycin D, 2 μ g/ml poly(I:C), 50 μ M CHX und 0,2 μ g/ml Doxorubicin behandelt. Danach wurden die Zellen lysiert und mittels Western Blot wurde der Status der Lamine A, C und B untersucht. **(C)** HeLa-Zellen wurden für 1 h mit 50 μ M Z-VAD-fmk vorbehandelt und dann in Anwesenheit von 50 μ M Z-VAD-fmk mit LACV und LACVdelINSs für 24 h mit einer MOI von 5 infiziert. Zusätzlich wurde die Infektion ohne Z-VAD-fmk durchgeführt. Nach der Lyse wurden die Level der Lamine A, C und B, sowie LACV N und Tubulin mittels Western Blot untersucht.

Interessanterweise ist mittels Immunfluoreszenz-Analyse zu beobachten, dass LACV und LACVdelINSs ebenfalls einen Einfluss auf das Nup153 haben, nachdem HeLa-Zellen für 6 h in An- und Abwesenheit von Z-VAD-fmk infiziert wurden (Abbildung 23). Bei LACV und LACVdelINSs verschwindet das Signal von Nup153 im Zellkern, wobei eine zeitgleiche Behandlung mit dem Caspase-Inhibitor ebenfalls zum Verschwinden des nukleären Signals führt. Daher scheint der nukleäre Verlust von Nup153 unabhängig von der Apoptose zu geschehen.

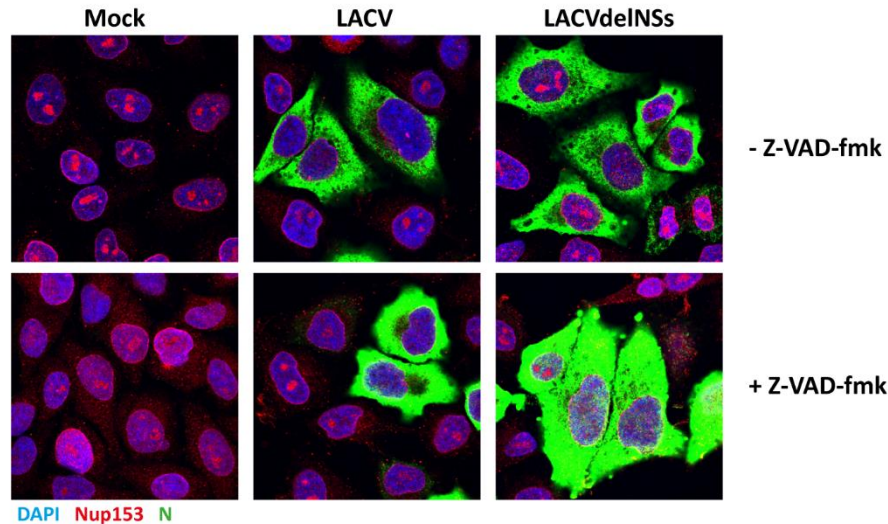


Abbildung 23 KLSM-Aufnahmen von Nup153 nach einer LACV-Infektion. HeLa-Zellen wurden mit LACV und LACVdeINSs mit einer MOI von 3 für 6 h infiziert. Dies erfolgte ebenso in Anwesenheit von 50 μ M Z-VAD-fmk. Anschließend erfolgte eine Immunfluoreszenzfärbung gegen Nup153 und LACV N.

7.5.1.2 LACV-Infektion beeinflusst mRNA-Exportfaktoren

Um zu untersuchen ob eine LACV-Infektion ebenfalls einen Einfluss auf mRNA-Exportfaktoren hat, wurden HeLa-Zellen für 6 h und 24 h mit einer MOI von 5 mit LACV und LACVdeINSs infiziert. Mittels Western Blot wurden die Level von Thoc2, Crm1, DDX19, UAP56, NXF1, PABP, Rae1 und ALY bestimmt (Abbildung 24 A). Die Level der Exportfaktoren Thoc2, Crm1, DDX19, UAP56, PABP und Rae1 bleiben nach einer Infektion unverändert, allerdings nehmen die Level von NXF1 und ALY bereits nach 6 h durch die Infektion mit LACV und LACVdeINSs ab. Da gemäß Kapitel 7.5.1.1 sowohl LACV als auch LACVdeINSs die Apoptose induzieren, was wiederum dazu führt, dass die Lamina gespalten werden, soll nun untersucht werden, ob NXF1 und ALY ebenfalls durch eine Induktion der Apoptose abgebaut werden. Beim entsprechenden Western Blot aus Kapitel 7.5.1.1 wurde ebenfalls gegen NXF1 und ALY gefärbt. Die Western Blot-Analyse in Abbildung 24 B zeigt, dass eine Induktion der Apoptose keinen Einfluss auf den Faktor ALY hat. Allerdings führt eine Behandlung mit Actinomycin D, CHX und Doxorubicin zu einem im Vergleich zu Mock schwächeren NXF1-Signal.

Als nächstes wurde untersucht, ob eine Hemmung der Apoptose durch den Caspase-Inhibitor Z-VAD-fmk einen Abbau von NXF1 und ALY durch LACV verhindern kann. Die Zellen wurden 1 h vor der Infektion mit Z-VAD-fmk vorbehandelt und dann für 24 h in Anwesenheit des Inhibitors mit LACV und LACVdeINSs infiziert. Der Western Blot in Abbildung 24 C zeigt, dass sowohl bei LACV als auch bei LACVdeINSs der Abbau von

NXF1 durch die Behandlung mit Z-VAD-fmk verhindert werden kann, ohne, dass die Level von LACV N reduziert werden. Folglich scheint der Abbau von NXF1 der Apoptose geschuldet zu sein. Der Abbau von ALY wird interessanterweise ebenfalls durch die Behandlung des Caspase-Inhibitors verringert, auch wenn vorherige Ergebnisse (Abbildung 24 B) zeigten, dass eine Induktion der Apoptose die Level von ALY nicht beeinflusst. Möglicherweise werden durch die Behandlung mit ZVAD-fmk solche Faktoren vom Abbau verschont, deren Fehlen einen negativen Einfluss auf ALY haben könnte.

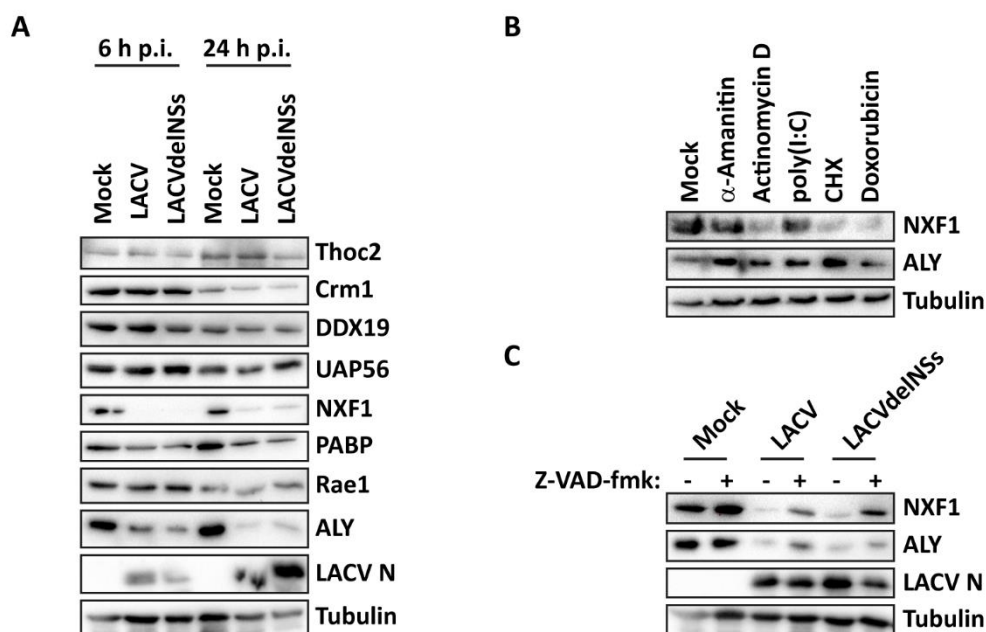


Abbildung 24 Western Blot-Analyse von mRNA-Exportfaktoren. **(A)** HeLa-Zellen wurden für 6 h und 24 h mit LACV und LACVdeINSs mit einer MOI von 5 infiziert, gefolgt von einem Western Blot, um den Status der essenziellen mRNA-Exportfaktoren zu untersuchen. **(B)** HeLa-Zellen wurden für 6 h mit 10 µg/ml α-Amanitin, 10 µg/ml Actinomycin D, 2 µg/ml poly(I:C), 50 µM CHX und 0,2 µg/ml Doxorubicin behandelt. Danach wurden die Zellen lysiert und mittels Western Blot gegen NXF1, ALY, und Tubulin gefärbt. **(C)** HeLa-Zellen wurden für 1 h mit 50 µM Z-VAD-fmk vorbehandelt und dann 24 h in Anwesenheit von 50 µM Z-VAD-fmk mit LACV und LACVdeINSs mit einer MOI von 5 infiziert. Zusätzlich wurde die Infektion ohne Z-VAD-fmk durchgeführt. Nach der Lyse wurden die Level von NXF1, ALY sowie LACV N und Tubulin mittels Western Blot untersucht.

Insgesamt zeigen bisherige Ergebnisse, dass nicht nur das NSs von RVFV einen mRNA-Exportblock induziert, indem es den mRNA-Exportrezeptor NXF1 moduliert und Bestandteile des NPCs in das Zytoplasma verlagert. Zusätzlich sind PTV-A, PTV-B, SFSV und LACV in der Lage, abhängig von NSs, die mRNA der Wirtszelle im Kern zurückzuhalten. Allerdings scheinen nur SFSV- und LACV-NSs den NPC zu beeinträchtigen. Bemerkenswerterweise gelingt es LACV auch unabhängig von NSs einen Exportblock zu induzieren. Darüber hinaus scheinen LACV und LACVdeINSs die Apoptose zu induzieren, was dazu führt, dass sowohl die Integrität des NPCs

herabgesetzt wird, als auch der mRNA-Exportrezeptor NXF1 abgebaut wird. Des Weiteren verändern LACV und LACV Δ INSs die nukleäre Lokalisation von Nup153 und führen zum Abbau des mRNA Exportfaktors ALY.

7.6 Einfluss von RVFV-NSs auf den Proteintransport

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass eine RVFV-Infektion zu einer Re-Lokalisation der Nukleoporene Nup214 und Nup358 in das Zytoplasma führt und es später in der Infektion ebenfalls zu einer Nup88-Reduktion kommt. Das Nup214 besitzt auf grund der FG- und FxFG-Wiederholungen eine hohe Affinität für den Proteinexport-Rezeptor Crm1 und wird zusammen mit Nup88 für den Crm1-vermittelten Protein-Export benötigt. Ein Fehlen von Nup214, Nup88 und Nup358 führt zu einem gestörten Proteinexport, wobei der Proteinimport weiterhin zu funktionieren scheint. Im Folgenden wird untersucht, ob eine RVFV-Infektion ebenfalls in den Proteintransport eingreift.

7.6.1 Einfluss von Leptomycin B und Ivermectin auf eine RVFV-Infektion

Da das RVFV ausschließlich im Zytoplasma repliziert und nicht auf die Transportwege in und aus dem Zellkern angewiesen ist wird zunächst geklärt, ob es für das RVFV von Vorteil ist, den Proteintransport zu stören. HeLa-Zellen wurden dafür mit den Transportinhibitoren Leptomycin B (LMB) und Ivermectin für 1 h vorbehandelt und dann mit RVFV- Δ NSs::Renilla, einem rekombinanten ZH548-Stamm, bei dem das NSs durch die Renilla Luziferase als Reportergen ersetzt wurde, infiziert. LMB hemmt den Crm1-vermittelten Export, indem es direkt an Crm1 bindet und verhindert so dessen Bindung an die NES der Kargo-Proteine (111). Ivermectin hemmt den Imp- α / β -vermittelten Protein-Import, indem es die NLS-Bindungsstelle des Imp- α blockiert (230). Nach 24 h und 48 h p.i. in Anwesenheit von LMB und Ivermectin erfolgte ein Luziferase-Assay (Abbildung 25 A). Nach 24 h zeigt sich kein Unterschied in der viralen Luziferase-Expression, wenn die Zellen mit LMB, mit Ivermectin oder mit beidem gleichzeitig behandelt wurden. Nach 48 h zeigt sich allerdings eine erhöhte Luziferase-Aktivität in den Zellen, die mit LMB und mit der Kombination aus LMB und Ivermectin behandelt wurden. Demnach ist es für die Replikation von RVFV ohne NSs förderlich, wenn der Proteinexport gestört wird.

Zur weiterführenden Analyse des Vorteils eines gestörten Proteintransports für das RVFV, wurden ebenfalls Zellen mit obigen Transportinhibitoren behandelt und mit rZH548 und Clone 13 infiziert. Nach 24 h und 48 h wurde der Überstand genommen und die Virustiter bestimmt (Abbildung 25 B). Das rZH548 erreicht zu beiden Zeitpunkten

geringfügig höhere Titer, wenn die Zellen mit LMB behandelt wurden. Behandlungen mit Ivermectin oder die Doppelbehandlung zusammen mit LMB zeigt keinen Effekt auf rZH548-Titer. Die Titer von Clone 13 steigen ebenfalls geringfügig nach 24 h bei LMB-Behandlung an. Allerdings erreichte der Titer mit LMB und mit Doppelbehandlung nach 48 h eine 10-fach höhere Konzentration im Vergleich zu unbehandelten Zellen.

Des Weiteren wurden auch HeLa-Zellen für Immunfluoreszenzen wie bereits oben beschrieben mit den gleichen Transportinhibitoren behandelt und dann für 24 h mit rZH-CF-NSs infiziert. Anschließend erfolgte eine Färbung gegen FLAG-NSs zum Nachweis einer generellen sowie einer zytoplasmatischen Lokalisation von NSs (Abbildung 25 C und D). Sowohl eine Behandlung mit LMB als auch mit Ivermectin führen im Vergleich zu unbehandelten Zellen zu einer erhöhten zytoplasmatischen Lokalisierung von RVFV-NSs. Unter Berücksichtigung der Virustiter und der Ergebnisse aus Kapitel 7.2.3 scheint es keinen negativen Effekt auf eine RVFV-Infektion zu haben, wenn sich das RVFV-NSs vermehrt zytoplasmatisch lokalisiert. Ebenso scheint es für die Infektion sogar förderlich zu sein, wenn der zelluläre Protein-Transport aus dem Zellkern in das Zytoplasma gestört ist. Weiterhin scheint ein gehinderter Protein-Import keinen Einfluss auf eine RVFV-Infektion zu haben.

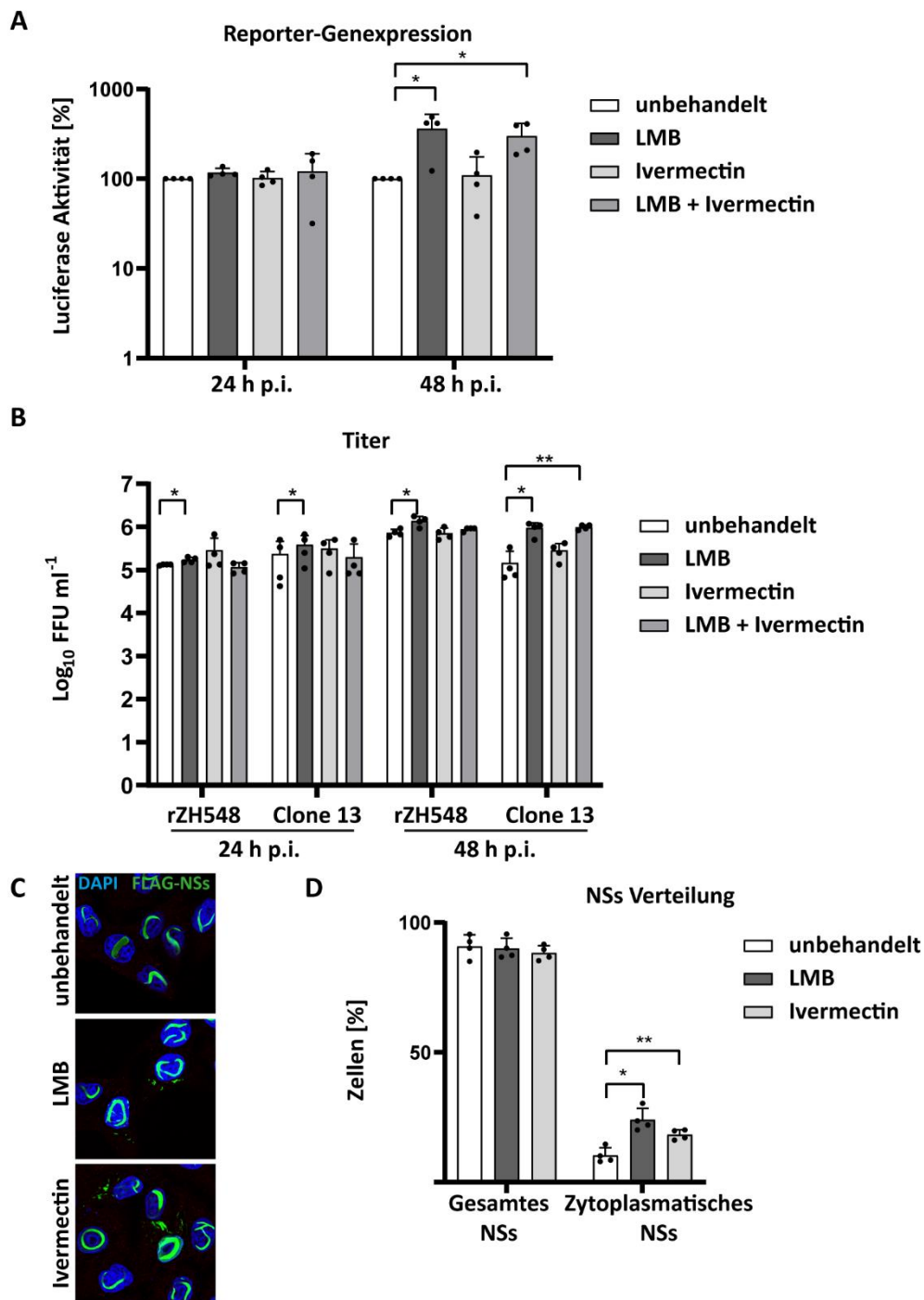


Abbildung 25 Einfluss der Transportinhibition auf eine RVFV-Infektion. **(A)** HeLa-Zellen wurden mit 16 nM LMB, 25 µM Ivermectin oder mit beiden gleichzeitig behandelt und dann mit RVFV-ΔNSs::Renilla (MOI 0,1) infiziert. Nach 24 h und 48 h erfolgte die Bestimmung der Genexpression mittels Luziferase-Assay. **(B)** HeLa-Zellen wurden mit den Transportinhibitoren LMB (16 nM) und Ivermectin (25 µM) behandelt und mit rZH548 und Clone 13 mit einer MOI von 0,1 infiziert. Nach 24 h und 48 h erfolgte die Bestimmung der Titer mittels Immunofocus-Assay. **(C)** HeLa-Zellen wurden ebenfalls mit rZH-CF-NSs mit einer MOI von 3 in der Anwesenheit der Inhibitoren für 24 h infiziert. Anschließend erfolgte eine Fixierung der Zellen und eine Immunfluoreszenzfärbung gegen FLAG-NSs. **(D)** Aus vier biologischen Replikaten wurden etwa 100 infizierte Zellen pro Replikat auf das Vorhandensein von NSs und die zytoplasmatische Lokalisierung von NSs überprüft. Die statistische Signifikanz wurde mittels zweiseitigem, gepaarten Student's t-Test ermittelt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$).

7.6.2 Nukleozytoplasmatischer Transport in infizierten Zellen

Um zu untersuchen ob der Proteinimport in den Zellkern nach einer RVFV-Infektion noch funktioniert, wurde ein Heterokaryon-Assay durchgeführt. Diese Methode basiert auf der Fusion zwischen Spender- und Empfängerzellen zweier verschiedener Spezies. Wenn ein Protein das ursprünglich im Zellkern der Spenderzelle lokalisiert war, nun ebenfalls im Zellkern der Empfängerzelle erscheint, bedeutet dies, dass dieses Protein sich hin- und her bewegen („shuttlen“) kann. Verbleibt dieses Protein allerdings im Zellkern der Spenderzelle, findet kein Transport statt. Im Kontext von RVFV-NSs wurden NIH3T3-Zellen für 24 h mit RVFV MP-12 infiziert und anschließend mit HeLa-Zellen fusioniert, die zuvor mit Reporter-Plasmiden transfiziert wurden. Als Reporter wurden hier GFP mit einer klassischen NLS beziehungsweise GFP mit einem M9-Transportsignal verwendet. Das GFP-NLS dient dazu, zu sehen, ob der Protein-Import in RVFV-infizierten Zellen weiterhin stattfindet. Das M9 ist eine Shuttling-Sequenz, die den bidirektionalen Transport von Proteinen ermöglicht, da sie sowohl NLS- als auch NES-Aktivität besitzt (131).

Abbildung 26 A zeigt HeLa-Zellen, die mit pEGFP-NLS transfiziert und mit RVFV MP-12-infizierten NIH3T3-Zellen fusioniert wurden. Erfolgt die Fusion der GFP-transfizierten HeLa-Zellen mit infizierten NIH3T3-Zellen, kann in beiden Zellkernen und im Zytoplasma das GFP-NLS-Signal detektiert werden. Zur Kontrolle wurde keine Fusion und zum anderen Fusionen mit nicht-infizierten Zellen durchgeführt. Bei pEGFP-NLS-transfizierten HeLa-Zellen, bei denen keine Fusion mit nicht-infizierten NIH3T3-Zellen induziert wurde, zeigt sich das GFP-NLS verstärkt im Zellkern, aber auch im Zytoplasma. Erfolgt die Fusion mit nicht-infizierten NIH3T3-Zellen, wird GFP-NLS in beiden Zellkernen sowie im Zytoplasma detektiert. Unbehandelte HeLa-Zellen, die nicht mit infizierten NIH3T3-Zellen fusioniert wurden, besitzen ebenfalls das GFP-NLS-Signal im Zellkern und in Zytoplasma.

In Abbildung 26 B wurden HeLa-Zellen mit pEGFP-M9 transfiziert. Das GFP-M9-Signal zeigt sich in HeLa-Zellen im Zellkern, wobei eine Fusion mit nicht-infizierten NIH3T3-Zellen auch zu einem Signal im NIH3T3 Zellkern führt. Anhand des GFP-M9-Signals bei fusionierten und infizierten Zellen, zeigt sich auch hier ein rein nukleäres Signal. Demnach zeigt Abbildung 26, dass trotz RVFV-Infektion der Protein-Transport in den Zellkern weiterhin stattfindet.

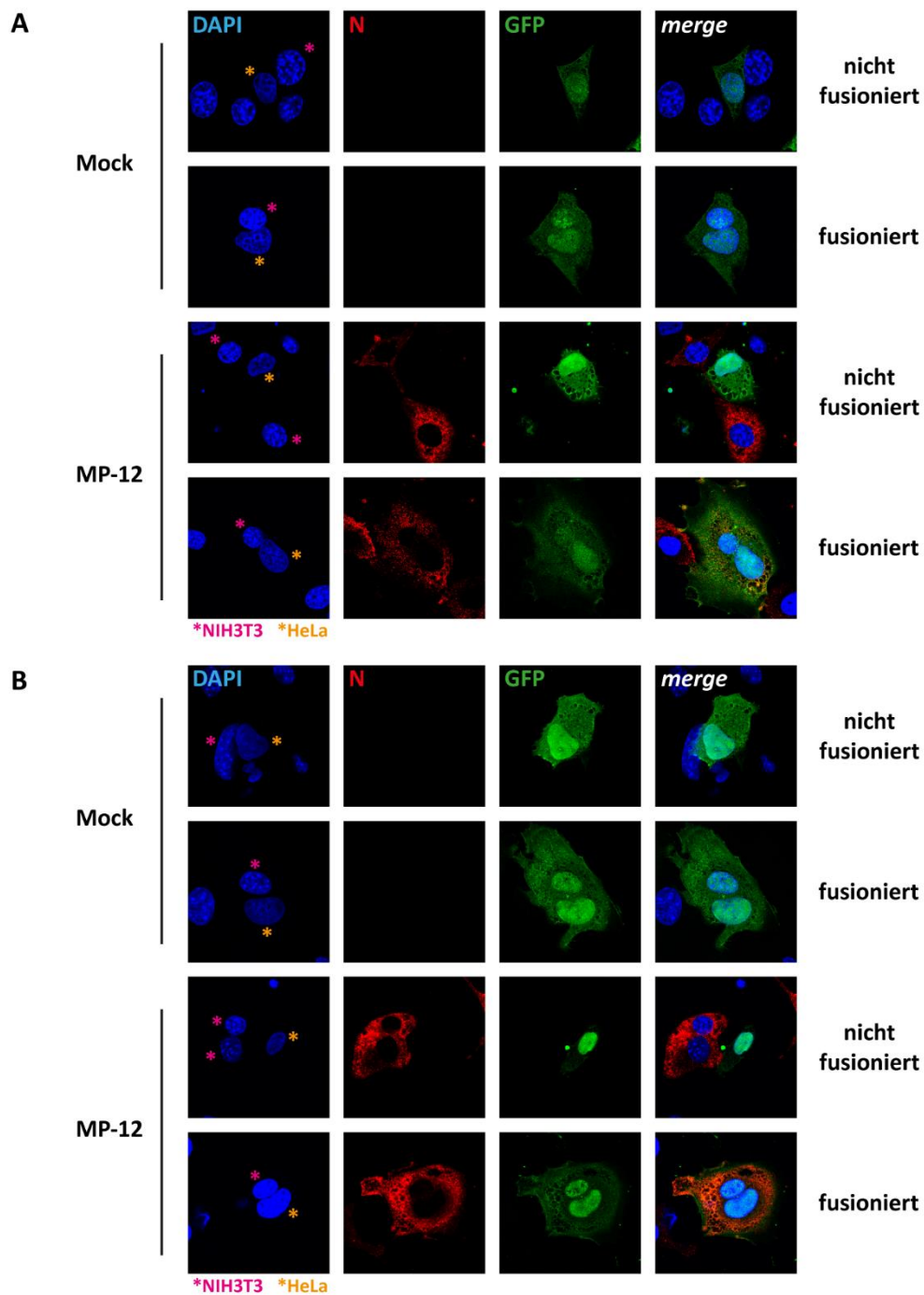


Abbildung 26 Heterokaryon-Assay zur Untersuchung des Protein-Transportes in RVFV-infizierten Zellen. HeLa-Zellen wurden entweder mit **(A)** pEGFP-NLS oder mit **(B)** pEGFP-M9 transfiziert. Nach 24 h wurden diese mit NIH3T3-Zellen fusioniert, die zuvor mit RVFV MP-12 für 24 h infiziert wurden. Die Fixierung und Färbung gegen RVFV N erfolgte 3 h nach der Fusion.

7.6.3 Massenspektrometrische Analyse fraktionierter RVFV-infizierter Zellen

Eine weitere Untersuchung, ob der Proteintransport durch RVFV-NSs gestört ist, bestand darin, Huh7-Zellen zu infizieren und dann zu fraktionieren. Die zytoplasmatische und die nukleäre Fraktion wurden dabei mittels Massenspektrometer analysiert, um herauszufinden, ob sich Proteine durch eine RVFV-Infektion umlagern. Zur Verifizierung, ob es sich um NSs-spezifische Effekte handelt, wurden die Huh7-Zellen zum einen ebenfalls mit Clone 13 infiziert und zum anderen auch mit den Transkriptionsinhibitoren α -Amanitin und Actinomycin D behandelt.

Die bioinformatische Auswertung der Massenspektrometrie-Daten ist als Venn-Diagramme in Abbildung 27 dargestellt (durchgeführt von Dr. Axel Weber, AG Kracht, Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie, Justus-Liebig-Universität Giessen). Sie stellen die Anzahl der Proteine dar, die in der zytoplasmatischen und in der nukleären Fraktion mit den jeweiligen Behandlungen im Vergleich zu Mock detektiert wurden. Auf diese Weise kann unter anderem unterschieden werden, wie viele Proteine spezifisch für die Behandlung detektiert wurden, aber auch, wie viele spezifische Proteine bei unterschiedlichen Behandlungen detektiert wurden. Diese Daten sind in zusätzlich im Anhang (Kapitel 12.1.2) in Tabelle 22 vereinfacht dargestellt.

Die Analyse der zytoplasmatischen Fraktion zeigt, dass bereits eine Inhibition der Transkription zu einer Umverteilung an Proteinen führt. Beispielsweise werden bei einer Behandlung mit α -Amanitin für 6 h spezifisch 14 Proteine gemessen. Es gibt nach 6 h allerdings auch 48 Proteine, die nicht nur bei α -Amanitin detektiert werden, sondern auch bei anderen Behandlungen. Die Anzahl an Proteinen, die durch α -Amanitin spezifisch zurückgehalten werden, nehmen im Laufe der Infektion zu. Eine RVFV-Infektion hält ebenfalls verschiedene Proteine im Zytoplasma zurück, wobei es spezifisch für NSs 28 Proteine nach 6 h und 48 Proteine nach 24 h sind. Die Betrachtung der Zellkern-Fraktion zeigt, dass bereits die Transkriptionsinhibition zu einer Retention von Proteinen im Zellkern führt: eine Behandlung mit α -Amanitin für 6 h hält spezifisch 80 Proteine zurück und nach 24 h steigt die Anzahl auf 93 Proteine. Der Transkriptionsinhibitor Actinomycin D hält nach 6 h spezifisch 131 Proteine zurück, allerdings nimmt diese Anzahl nach 24 h auf 43 Proteine ab. Nach 6 h p.i. mit dem NSs-deletierten Virus Clone 13 kommt es zu einer Retention von 35 Proteinen, während NSs-spezifisch nur 4 Proteine detektiert werden, wobei die Anzahl der detektierten Proteine im Laufe der Infektion ansteigt. Demnach führt NSs unabhängig vom Transkriptionsblock zu einer zytoplasmatischen Retention und einer Zurückhaltung von Proteinen im Zellkern.

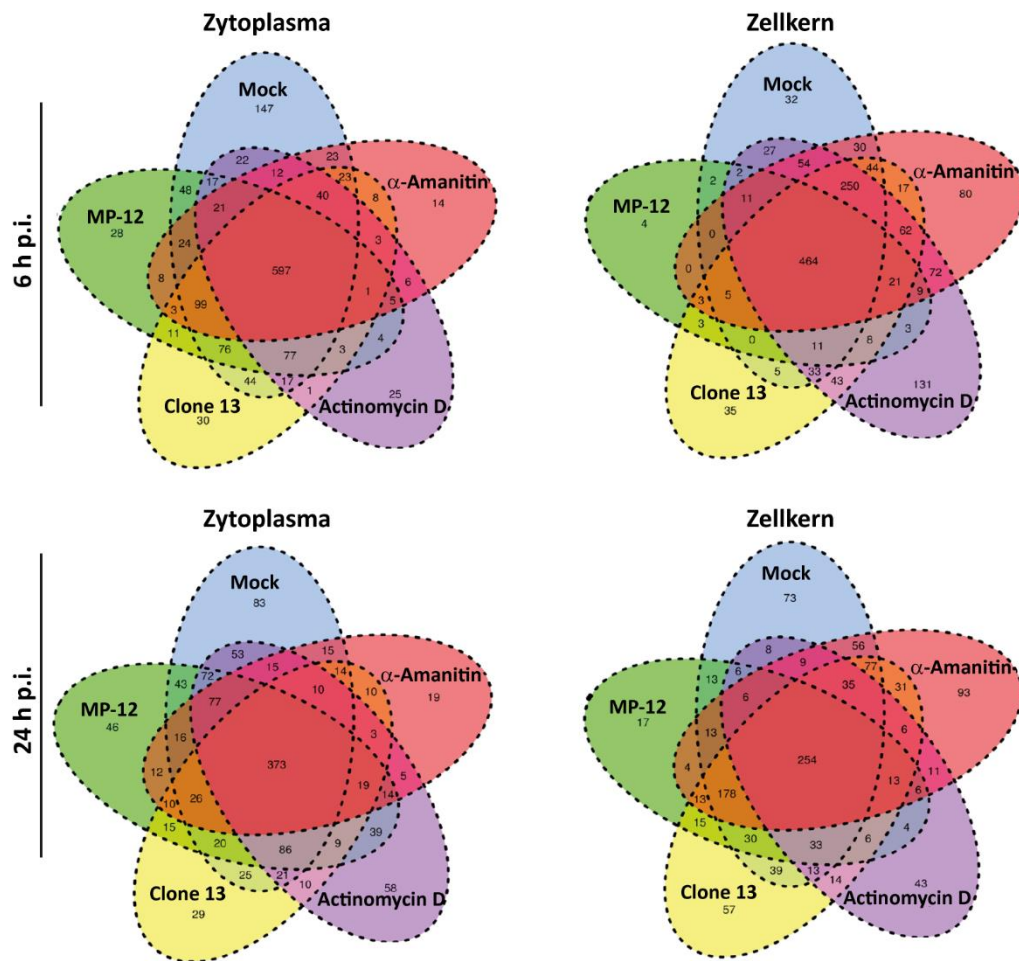


Abbildung 27 Bioinformatische Auswertung der Massenspektrometrie-Daten infizierter und fraktionierter Zellen. Huh7-Zellen wurden mit einer MOI von 5 für 6 h und 24 h mit RVFV MP-12 und Clone 13 infiziert. Ebenso erfolgte parallel eine Behandlung mit α -Amanitin und Actinomycin D. Die Zellen wurden anschließend fraktioniert und massenspektrometrisch untersucht. Die Anzahl an identifizierten Proteinen aus jeder Fraktion und Behandlung wurde mittels Venn-Diagrammen dargestellt. Diese Daten sind in zusätzlich im Anhang (Kapitel 12.1.2 in Tabelle 22) vereinfacht zusammengefasst.

Die hier durchgeführte massenspektrometrische Analyse ermittelt nicht nur die Anzahl der Proteine, sondern auch um welche Proteine es sich handelt. Um die Zuordnung der Massenspektrometrie zu verifizieren, wurden die ermittelten Proteine die spezifisch für die jeweiligen Behandlungen und Fraktionen detektiert wurden, zuerst mittels der STRING-Datenbank in funktionale Cluster gruppiert. Anschließend wurde bestimmt, welches der Proteine eine andere Lokalisierung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle aufweist. Da sich diese Arbeit mit RNA- und Protein-Transportwegen beschäftigt, wird die weitere Analyse auf Proteine beschränkt, die im Transport-Block involviert sein könnten. In Tabelle 21 ist eine Auswahl an Proteinen aufgelistet, die im Folgenden diesbezüglich verifiziert werden.

Tabelle 21 Auswahl an Proteinen der massenspektrometrischen Analyse die zur Verifizierung in ihrer Beteiligung beim Transportblock.

Protein	KEGG	Lokalisation Mock	Umverteilt durch
CPSF6	mRNA-Überwachung	Zellkern	MP-12, Clone 13, α -Amanitin
EFTUD2	Spliceosom	Zellkern	MP-12, ActD
LSM2	RNA-Abbau, Spliceosom	Zellkern	MP-12, Clone 13
LSM3	RNA-Abbau, Spliceosom	Zellkern	MP-12
PRPF8	Spliceosom	Zellkern	MP12, ActD
PSMA4	Proteasome	Zytoplasma	MP-12
Ran	RNA-Transport	Zellkern	MP-12, ActD
SF3B4	Spliceosom	Zellkern	MP12, α -Amanitin
SRRT	DNA-Bindung; Nukleinsäurebindung	Zellkern	MP12, α -Amanitin, ActD
SRSF1	Spliceosom	Zellkern	-
SRSF3	Spliceosom	Zellkern	MP-12

Zunächst wurden HeLa-Zellen mit rZH548 und Clone 13 infiziert und anschließend die Level der in Tabelle 21 aufgelisteten Proteine mittels Western Blot bestimmt (Abbildung 28 A). Weder eine Infektion mit rZH548 noch mit Clone 13 scheint die Proteinlevel im Vergleich zu Mock zu verändern. Für LSM3 konnte keine Aussage getroffen werden, da dieser Antikörper nicht für Western Blot-Analysen geeignet ist.

Zur Verifizierung der mittels Massenspektrometrie bestimmten Umverteilungen wurden Immunfluoreszenzanalysen durchgeführt. Hierbei wurden HeLa-Zellen mit rZH548 und Clone 13 für 24 h infiziert sowie mit den Transkriptionsinhibitoren behandelt (Abbildung 28 B). Für SRSF3 stellt sich heraus, dass die Antikörper nicht für Immunfluoreszenz-Analysen geeignet sind. Ebenso zeigt sich, dass sich die Lokalisierung von PSM4A, LSM2, LSM3, SRRT und SRSF1 weder durch Infektion mit rZH548 und Clone 13 noch durch die Transkriptionsinhibitoren detektierbar verändert.

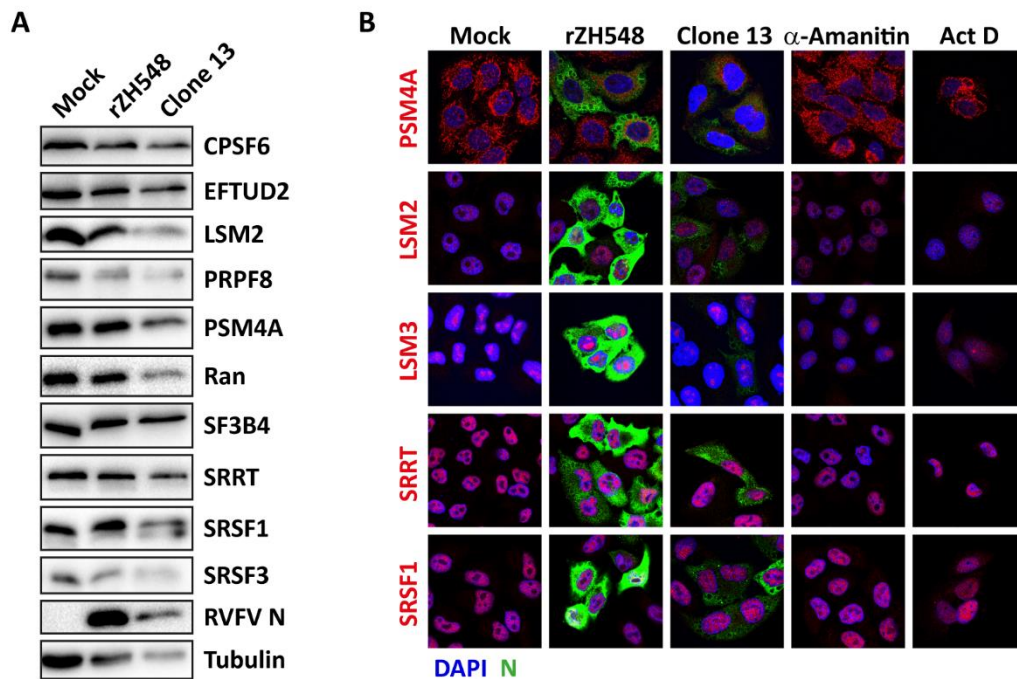


Abbildung 28 Western Blot und KLSM-Aufnahmen zur Verifizierung der massenspektrometrischen Daten. **(A)** HeLa-Zellen wurden für 24 h mit einer MOI von 5 mit rZH548 und Clone 13 infiziert. Anschließend erfolgte die Lyse der Zellen gefolgt von einem Western Blot bei dem die Proteine von Interesse untersucht wurden. **(B)** HeLa-Zellen wurden für 24 h mit einer MOI von 3 mit rZH548 und Clone 13 infiziert. Nach der Fixierung erfolgte eine Immunfluoreszenzfärbung gegen PSM4A, LSM2, LSM3, SRRT, SRSF1 sowie gegen RVFV N.

KLSM-Aufnahmen in Abbildung 29 A zeigen, dass es zu keiner Umverteilung von CPSF6 vom Zellkern in das Zytoplasma kommt. Allerdings führt eine Behandlung mit Actinomycin D für 6 h dazu, dass sich die ebenmäßige nukleäre Verteilung von CPSF6 zu punktförmigen Aggregaten im Zellkern verändert. Nach Fortschreiten der Infektion wird dies ebenfalls nach 24 h bei rZH548-infizierten Zellen beobachtet. Bei Betrachtungen des Faktors EFTUD2 (Abbildung 29 B) zeigt sich, dass es nach 6 h zu einem zusätzlichen Signal im Zytoplasma bei rZH548- und Clone 13-infizierten Zellen kommt. Bei rZH548-infizierten Zellen ist das Signal noch relativ schwach und diffus im Zytoplasma verteilt, wohingegen bei Clone 13-infizierten Zellen zytoplasmatische Aggregate gebildet werden. Nach 24 h nimmt das zytoplasmatische Signal bei rZH548-infizierten Zellen zu, wobei es bei Clone 13 zu keiner Verstärkung der Aggregatbildung zu kommen scheint.

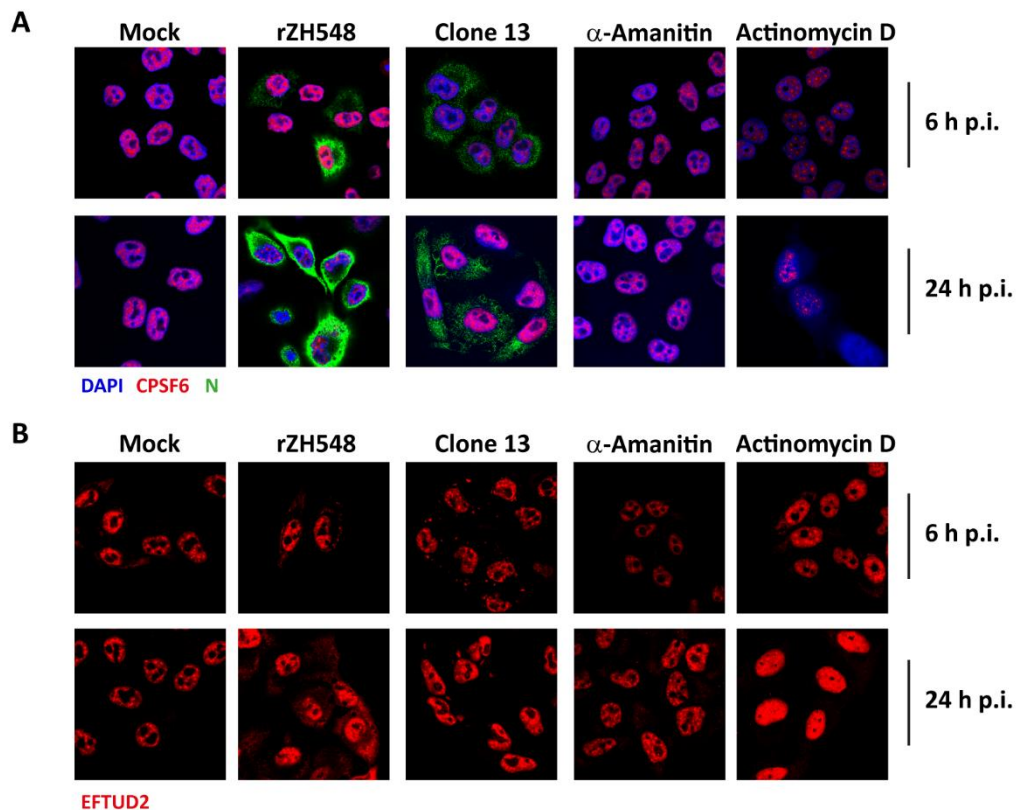


Abbildung 29 Immunfluoreszenz-Analysen von **(A)** CPSF6 und **(B)** EFTUD2 nach einer RVFV-Infektion. HeLa-Zellen wurden mit einer MOI von 3 mit rZH548 und Clone 13 infiziert. Ebenso erfolgte eine Behandlung mit 10 μ g/ml α -Amanitin und 10 μ g/ml Actinomycin D. Nach den entsprechenden Zeitpunkten erfolgte eine Fixierung gefolgt von der Immunfluoreszenz-Färbung mit Antikörpern gegen CPSF6 (A) und RVFV N bzw. EFTUD2 (B).

Betrachtungen von PRPF8 und SF3B4 in Abbildung 30 zeigen kein Einfluss von rZH548 auf die Verteilung der Proteine. Allerdings führt eine Infektion mit Clone 13 zu einer zusätzlichen Ansammlung der Proteine im Zytoplasma. Bei PRPF8 bilden sich bereits nach 6 h Aggregate im Zytoplasma, wobei es scheint, dass auch umliegende, nicht infizierte Zellen diese Aggregate bilden. Für SF3B4 kommt es nach 6 h zu einem zusätzlichen diffusen Signal im Zytoplasma, wobei sich nach 24 h ebenfalls Aggregate im Zytoplasma bilden.

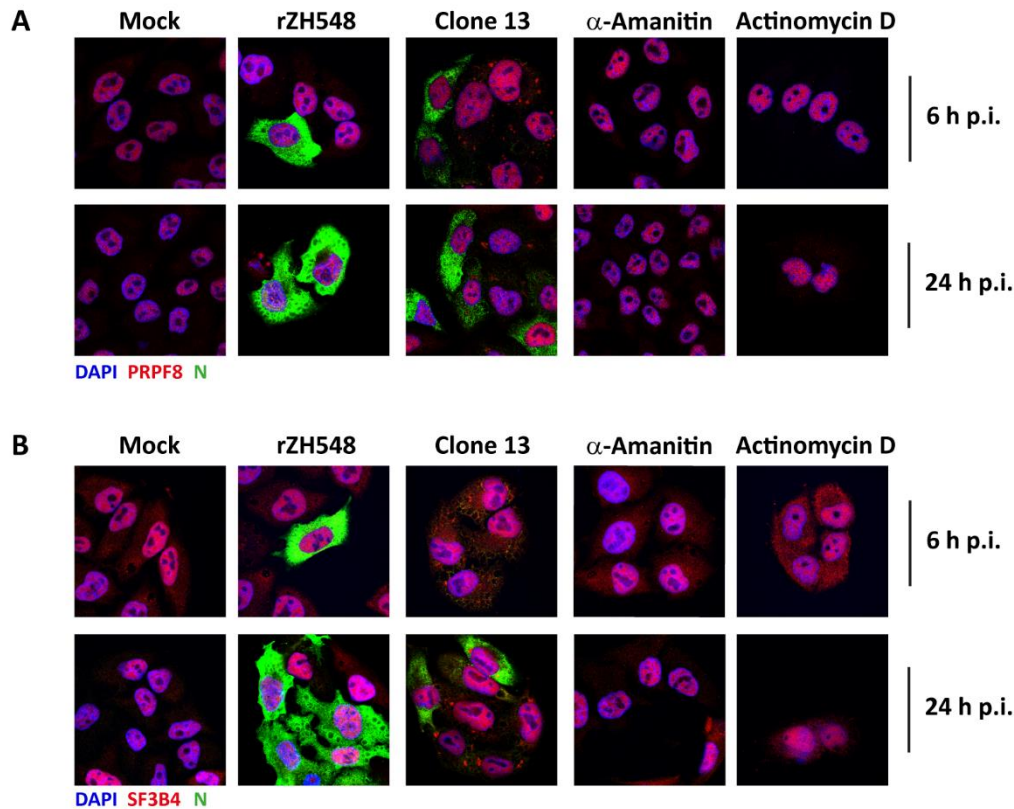


Abbildung 30 Immunfluoreszenz-Analysen von PRPF8 und SF3B4 nach einer RVFV-Infektion. HeLa-Zellen wurden mit einer MOI von 3 mit rZH548 und Clone 13 infiziert. Ebenso erfolgte eine Behandlung mit 10 μ g/ml α -Amanitin und 10 μ g/ml Actinomycin D. Nach den entsprechenden Zeitpunkten erfolgte eine Fixierung gefolgt von der Immunfluoreszenz-Färbung mit Antikörpern gegen **(A)** PRPF8 bzw. **(B)** SF3B4 sowie RVFV N.

In dieser Arbeit konnte erfolgreich gezeigt werden, dass RVFV-NSs eine weitere Strategie anwendet, um antiviralen Mechanismen der Zelle entgegenzuwirken: das RVFV-NSs führt zu einer Zurückhaltung der zellulären mRNA im Zellkern (siehe Kapitel 7.1). Die Kapitel 7.2 und 7.3 legen dar, dass RVFV-NSs die Faktoren Nup98, Rae1 und NXF1 beeinflusst, welche essenziell für den mRNA-Transport sind. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine RVFV-Infektion eine Umverteilung von Nup214 und Nup358 aus dem NPC in das Zytoplasma vermittelt (siehe Kapitel 7.4). Dies beeinträchtigt womöglich die Translokation und die gerichtete Freisetzung der mRNPs. Dieses Kapitel zeigt, dass, auch wenn Nup214 und Nup358 für den Proteinimport benötigt werden, eine RVFV-Infektion den Proteinimport nicht zu hemmen scheint. Allerdings weist diese Arbeit auch nach, dass spezifische Proteine, insbesondere Proteine, die in der mRNA-Prozessierung beteiligt sind, nach einer RVFV-Infektion eine andere Lokalisation aufweisen. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass RVFV-NSs auf verschiedenen Ebenen in den mRNA-Export eingreift.

8 Diskussion

Das RVFV inhibiert mittels seines Virulenzfaktors NSs die IFN-Antwort, indem es die Transkription der Wirtszelle durch die Induktion des proteasomalen Abbaus von Untereinheiten des Transkriptionsfaktor TFIID inhibiert, die IFN- β -Promoter-Aktivierung hemmt und den proteasomalen Abbau der PKR vermittelt (99, 117, 118). Da eine Inaktivierung dieser NSs-Funktionen die Genexpression der Wirtszellen nicht völlig wiederherstellt, befasste sich diese Arbeit mit der Frage, ob der Virulenzfaktor NSs weitere Mechanismen besitzt, um die IFN-Antwort zu unterdrücken. Kooperationspartner konnten experimentell bereits zwei mRNA-Exportfaktoren bei den Wirtszell-Interaktoren des NSs identifizieren (158). Aus diesem Grund konzentrierte sich diese Arbeit auf die Rolle des NSs im Bezug auf zelluläre Transportwege.

8.1 Multifaktorielle Induktion eines mRNA-Exportblocks durch NSs

In dieser Arbeit konnte erfolgreich ein neuer Mechanismus von RVFV-NSs identifiziert werden. Die KLSM-Aufnahmen in Kapitel 7.1 zeigen, dass das RVFV-NSs zu einer Retention von poly(A)-RNA der Wirtszelle im Zellkern führt. Die Regulation der angeborenen Immunantwort erfolgt auf mehreren Ebenen, einschließlich auf der Ebene des nukleo-zytoplasmatischen Transports. Hierbei ist der nukleare Export von mRNAs, die für Abwehrproteine kodieren, für eine Immunantwort entscheidend. Neben dem RVFV induziert eine Vielzahl von Viren eine Retention von mRNAs im Zellkern, um besser replizieren zu können: beispielsweise bindet das NS1 von Influenza A an Faktoren, die an der Prozessierung und dem Export von zellulärer mRNA beteiligt sind, um so die IFN-Antwort zu unterdrücken (114). Das VSV-M-Protein interagiert mit Rae1 und Nup98, was einen mRNA-Exportblock induziert (54).

Die Ergebnisse aus Kapitel 7.1 zeigen in diesem Zusammenhang, dass der mRNA-Exportblock durch RVFV unabhängig vom NSs-induzierten Transkriptionsblock zu sein scheint, da eine Behandlung mit Transkriptionsinhibitoren im Vergleich zur Infektion erst sehr spät die mRNA im Zellkern zurückhält (Abbildung 6 B). Die Inhibitoren wirken sofort auf die Zelle und nicht, wie NSs stufenweise, da es zuerst von der Zelle exprimiert werden muss. Folglich geschieht der NSs-vermittelte Exportblock unabhängig und zeitlich vor dem Transkriptionsblock, wobei ein additiver Effekt durch den Transkriptionsblock nicht auszuschließen ist. Da das RVFV ausschließlich im Zytoplasma repliziert (26) ist es nicht darauf angewiesen, dass virale RNA aus dem Kern transportiert werden muss. Somit verringert ein mRNA-Exportblock die Konkurrenz um

die Translationsmaschinerie und stellt somit einen Vorteil für die Replikation dar, da z.B. mRNAs antiviraler ISGs nicht exportiert und translatiert werden können.

8.1.1 NSs-Interaktion mit Nup98 und Rae1

Die mRNA-Exportfaktoren Rae1 und Nup98 sind essenziell, um mRNA in das Zytoplasma zu transportieren und wurden ursprünglich durch Ko-Immunopräzipitation mit anschließender Massenspektrometrie-Analyse als NSs-interagierende Wirtsfaktoren identifiziert (158). In dieser Arbeit konnten diese Interaktionen mit weniger sensitiven Methoden nicht robust nachgewiesen werden (Kapitel 7.2.2). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese Interaktionen über einen noch unbekannten Mediator vermittelt werden, der bei dem hier verwendeten Versuchsaufbau nicht berücksichtigt wurde. Interessanterweise wurde gezeigt, dass Nup98 mit einer Reihe von Transkriptionsfaktoren interagiert und die Expression von bestimmten Genen reguliert (153). Einer dieser Transkriptionsfaktoren ist YY1, mit welchem auch NSs interagiert, um die IFN- β -Induktion zu hemmen (118). Möglicherweise findet die Interaktion von NSs mit Nup98 und Rae1 aber nur transient und zeitlich begrenzt statt. Unter der Annahme, dass tatsächlich eine Interaktion von NSs mit Rae1 und Nup98 stattfindet, kann eine Beeinträchtigung der Funktionen dieser mRNA-Exportfaktoren vermutet werden, die dann in einem gestörtem mRNA-Export resultiert. Zudem könnten natürlich vorkommende Interaktionen von Nup98 und Rae1 mit anderen Exportfaktoren, wie zum Beispiel mit NXF1, durch Bindung an das NSs verhindert werden. Ein solches Szenario wurde bereits von Faria *et al.* in VSV-infizierten Zellen beschrieben: Das M-Protein des VSV interagiert mit Rae1 und Nup98 und verhindert die Interaktion der RNA-Exportfaktoren miteinander, wobei es zur Bildung unfähiger Exportkomplexe kommt (54). Um die Hypothese, dass das NSs eine solche Interaktion behindert, zu bestätigen, müssen in der Zukunft weitere Interaktionsstudien durchgeführt werden. Ebenso ist es möglich, dass NSs an weitere Komponenten des NXF1-NXT1-Heterodimers bindet.

In dieser Arbeit konnte kein Abbau von Rae1 und Nup98 gezeigt werden und ebenso änderte sich die Lokalisation von Nup98 nicht (Kapitel 7.2.1). Daher scheinen Rae1 und Nup98 im Gegensatz zu anderen Zielen des NSs nur vorübergehend und ohne Konsequenzen für ihre Lokalisierung oder Stabilität mit NSs zu interagieren. Wenn jedoch ein Nup98-*knock-down* durchgeführt wird, erhöht sich die zytoplasmatische Fraktion von NSs, wohingegen ein *knock-down* von Nup62, welches als Kontrolle diente, nur einen geringfügigen Einfluss hat (Kapitel 7.2.3). Die veränderte Lokalisierung des NSs beeinträchtigt allerdings nicht den Abbau des im Zellkern befindlichen TFIIF-p62,

wahrscheinlich durch das verbleibende NSs im Kern. Das Nup98 besitzt GLFG-Wiederholungsdomänen, die als zytoplasmatische Andockstellen für Kerntransportsubstrate dienen. Sowohl das NSs als auch die Nups enthalten intrinsisch ungeordnete Regionen, die zu multivalenten Wechselwirkungen mit niedriger Affinität neigen. Dies erklärt möglicherweise die Rolle von Nup98 beim Import von NSs einerseits und das Fehlen einer robust nachweisbaren Interaktion andererseits.

Zusätzlich fallen die Titer des WT-Stammes in Abwesenheit von Nup98 und Rae1 um fast 10-fach ab, wohingegen die Abwesenheit von Nup62 keinen Einfluss auf die Titer hat (Kapitel 7.2.3). Überraschenderweise reduzierte sich auch der Titer des NSs-deletierten Stammes Clone 13, auch wenn die Werte keine Signifikanz erreichten. Darüber hinaus stellt eine Nup98-Depletion die IFN-Induktion nicht wieder her. Allerdings könnte der Nup98-*knock-down* zu einem allgemeinen Defekt beim Kernimport von Transkriptionsfaktoren für die IFN- β -Promoteraktivierung führen. Dadurch kann dann keine IFN-Induktion durch rZH548 detektiert werden. Dies wird durch die Tatsache unterstützt, dass die starke IFN-Induktion des NSs-deletierten Stammes Clone 13 nach einer Nup98-Depletion reduziert wurde. Eine verringerte IFN-Induktion könnte auf den erwähnten Transportdefekt durch den Nup98-*knock-down* zurückzuführen sein, wird jedoch auch aufgrund der Rolle von Nup98 und Rae1 bei der antiviralen Genexpression auch so erwartet (153). So können Nup98 und Rae1 eine NSs-unabhängige Rolle im viralen Replikationszyklus spielen, möglicherweise im nukleären Export von Kofaktoren, die für die Replikation im Zytoplasma erforderlich sind, oder in der Expression von Wirtsgenen, die für die Virusreplikation erforderlich sind.

8.1.2 RVFV-NSs manipuliert mRNA-Exportfaktoren

Da die vorherigen Versuche nicht erklären können, wie der mRNA-Exportblock durch das RVFV-NSs zu Stande kommt, wurde der Status essenzieller mRNA-Exportfaktoren untersucht. Die Western Blot-Analysen (Kapitel 7.3) zeigen, dass sich die Level der Exportfaktoren nach einer RVFV-Infektion nicht verändern. Lediglich durch Immunfluoreszenz-Analysen lässt sich ein Einfluss des RVFV NSs auf NXF1 und PABP nachweisen. Der Exportrezeptor NXF1 ermöglicht das Andocken der mRNA-Export-Komplexe an den NPC und wird NSs-spezifisch umverteilt, was möglicherweise eine Einschränkung des mRNA-Exportrezeptors, und folglich des mRNA-Exports, verursacht. Zwar zeigt sich die Umverteilung an den Rand des Zellkerns auch durch die Behandlung mit Transkriptioninhibitoren, allerdings fällt diese im Vergleich schwächer aus und findet erst sehr spät nach der Behandlung statt. Der Exportrezeptor NXF1 bewegt sich normalerweise an mRNAs gebunden, zum NPC, wo es zur Konformationsänderung der mRNPs an den zytoplasmatischen Filamenten des NPCs kommt. Dann erfolgt die

Freisetzung der mRNAs und NXF1 wird vom Zytoplasma in den Zellkern zurücktransportiert. Demnach suggerieren die Immunfluoreszenz-Analysen, dass NXF1 im NPC hängen bleibt und es somit auch nicht zur Konformationsänderung der mRNPs kommt. Die KLSM-Aufnahmen in Kapitel 7.3.1 zeigen, dass eine Beeinträchtigung von NXF1 tatsächlich zu einem mRNA-Exportblock führt. Entgegen der Erwartungen zeigt sich allerdings, dass das Fehlen von NXF1 keinen Vorteil für eine RVFV-Infektion darstellt, da sich die Titer nach einer NXF1-Depletion nicht veränderten (Abbildung 13 A). Ein NXF1-*knock-down* führt bei Clone 13 sogar zu einer leichten Reduktion der Titer, wobei auch eine leicht vermehrte IFN-Induktion zu detektieren ist (Abbildung 13 B). Letzteres könnte die verminderten Titer erklären. Dies ist auf den ersten Blick überraschend, da publiziert ist, dass NXF1 bevorzugt Transkripte mit wenigen oder langen Introns exportiert (254). Diese Eigenschaft trifft auf viele der unmittelbar frühen Gene zu, die als Reaktion auf Virusinfektionen wirken. Allerdings vermuteten Zuckerman *et al.*, dass TREX und NXF1 beim Export der meisten polyadenylierten Transkripte kooperieren, jedoch die verschiedenen Transkripte mit unterschiedlichen Mengenverhältnissen mit TREX und NXF1 interagieren (254). Weiterhin ist es möglich, dass manche Transkripte unabhängig von NXF1 exportiert werden, wie es für eine Teilmenge an mRNAs demonstriert wurde (239). Demnach kann die Kooperation von TREX und NXF1, sowie ein NXF1-unabhängiger Weg erklären, warum hier mehr IFN nachgewiesen wird.

Der Exportrezeptor NXF1 liegt in einem Heterodimer mit NXT1 vor. Aufgrund eines Fehlens geeigneter Antikörper konnte in dieser Arbeit nicht ermittelt werden ob NXT1 durch eine RVFV-Infektion direkt oder indirekt durch den Einfluss auf NXF1 beeinträchtigt wird. Allerdings konnte von Pinkham *et al.* durch Gesamt-Transkriptom-*Shotgun*-Sequenzierung gezeigt werden, dass NXT1 eines der am häufigsten durch RVFV-Infektion herunterregulierten Gene war (161). Eine andere Studie ergab jedoch, dass es keine messbaren Unterschiede in der NXT1-Expression nach einer RVFV-Infektion im Vergleich zu nicht-infizierten Zellen gibt (37). Dennoch zeigte diese Studie, dass NSs am Promoter von NXT1 vorhanden ist (37). Um die Frage, ob NSs einen Einfluss auf NXT1 hat, eindeutig beantworten zu können, bedarf es daher weiterer Untersuchungen.

Zusätzlich zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass es nach einer RVFV-Infektion zu einer Umlagerung von PABP in den Zellkern kommt, wobei es sich hier um einen sekundären Effekt handelt (Kapitel 7.3). Das PABP besitzt eine NLS, die normalerweise von gebundener mRNA maskiert wird, was zur Folge hat, dass es nicht über den Imp- α/β -Weg in den Zellkern transportiert werden kann (112). Sowohl eine RVFV-Infektion als auch die Behandlung mit den Transkriptionsinhibitoren führt zu einer Retention von

mRNA im Zellern, was wiederum dazu führt, dass die *NLS* nun freiliegt und das PABP folglich in den Zellkern transportiert wird. Copeland *et al.* demonstrierten ebenfalls, dass sich PABP in den Zellkern verlagert, wenn Zellen mit RVFV infiziert wurden und vermuteten ebenfalls, dass dies ein sekundärer Effekt durch den Transkriptionsblock ist (36). Zudem bewiesen sie, dass ein Fehlen von PABP keinen Einfluss auf eine RVFV-Infektion hat. Da PABP auch eine wichtige Rolle in der Translation spielt, testeten Copeland *et al.* ebenfalls, ob sich die Translation unter RVFV-Infektion verändert. So zeigt sich 18 h p. i. eine Hemmung der zellulären Translation. Es ist zwar bekannt, dass ein Fehlen von PABP die Translation hemmt (202), allerdings ist im Falle des RVFV die Umlagerung von PABP nicht der alleinige Faktor. Zusätzlich muss der NSs-induzierte Transkriptionsblock und der mRNA-Exportblock mitberücksichtigt werden, der die Menge an verfügbaren mRNAs reduziert, was somit zu einer verminderten zellulären Translation führt.

8.1.3 RVFV-NSs führt zu Umlagerungen von Nukleoporinen

Ein weiterer Angriffspunkt, um einen mRNA-Exportblock zu induzieren ist der Kernporenkomplex. mRNAs werden u. a. von NXF1 und Rae1 zunächst an den *NPC* und dort über Interaktionen mit verschiedenen Nups an die zytoplasmatische Seite des *NPCs* transportiert (22, 102, 120). Dort kommt es zu Konformationsänderungen der mRNPs, die eine Freisetzung der mRNAs in das Zytoplasma ermöglichen (222, 229).

In dieser Arbeit konnte außerdem gezeigt werden, dass eine RVFV-Infektion den *NPC* stört (Kapitel 7.4.1). Dies geschieht nicht durch eine Induktion der Apoptose, Abbau von FG-Nups oder Verlust der *NPC*-Integrität durch den Abbau der Lamina, sondern durch Umlagerungen einiger Nups in das Zytoplasma. Zum einen wird indirekt durch den vermittelten Transkriptionsblock Nup358 teilweise in das Zytoplasma verlagert und das nukleäre Signal von Nup153 verschwindet. Zum anderen wird spezifisch und unabhängig vom Transkriptionsblock eine Aggregatbildung von Nup214 im Zytoplasma induziert. Es konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden, was die Umlagerung von Nup214 in das Zytoplasma verursacht. Die Nukleoporine Nup214 und Nup358 sind über Nup88 in der Kernpore verankert. Zwar kann bei einer RVFV-Infektion auch eine Reduktion von Nup88 detektiert werden, allerdings erst sehr spät nach der Infektion. Da die NSs-abhängige Reduktion von Nup88 erst spät in der Infektion erfolgt, scheint dies nicht die Ursache der Relokalisation von Nup214 zu sein. Ein additiver Effekt auf die Relokalisation ist hier aber nicht auszuschließen. Wu *et al.* beschreiben in diesem Zusammenhang, dass eine Nup98-Depletion zu einer Nup214-Relokalisation führt (243).

Unter der Voraussetzung, dass NSs tatsächlich mit Nup98 interagiert und somit weitere Interaktionen verhindert, lassen die Daten von Wu *et. al.* die Schlussfolgerung zu, dass Nup214 dadurch umverteilt wird. Dem ist entgegenzuhalten, dass Nup98-*knock-down*-Experimente in dieser Arbeit gezeigt haben, dass es neben einer Umverteilung von Nup214 auch zu Aggregatbildungen der anderen untersuchten Nups kommt (Kapitel 7.4.4). Auch unter der Berücksichtigung, dass in diesem Fall ein *knock-down* effizienter ist als eine NSs-Sequestrierung, scheint es nicht der Grund für die Umverteilung von Nup214 zu sein.

Einige Nups werden während der Mitose teilweise phosphoryliert, was zur vorübergehenden Dissoziation des NPCs beiträgt. Im Kontext einer Virusinfektion haben andere Gruppen bereits gezeigt, dass L-Proteine von Cardioviren eine Hyperphosphorylierung von Nup214, Nup153, Nup98 und Nup62 vermitteln, um generell Transportwege zu stören (8, 34). So zeigen beispielsweise Bardina *et al.* Hyperphosphorylierung von Nup62 in Mengovirus-infizierten Zellen als möglichen Mechanismus der induzierten Permeabilisierung der Kernporen (8). Ob RVFV-NSs eine Phosphorylierung von Nups vermittelt ist allerdings noch zu untersuchen.

8.1.4 NSs-Phänotypisierung und Modell

Um besser zu verstehen, welche der beobachteten Effekte spezifisch für NSs sind und welche, unabhängig vom Transkriptionsblock, sekundäre Effekte sein könnten, die den mRNA-Exportblock erklären, wurden verschiedene *knock-down*-Experimente durchgeführt (Kapitel 7.4.4). Konkret wurden Zellen mit siRNAs gegen Rae1, NXF1, Nup98, Nup214 und Nup62 transfiziert und der Status der Nups (Nup98, Nup214, Nup62, Nup88, Nup153 und Nup358), poly(A)-RNA und der Exportfaktoren DDX19, NXF1 und ALY mittels Immunfluoreszenz ermittelt, um sie mit den Effekten von NSs und den Transkriptionsinhibitoren zu vergleichen.

Der mRNA-Exportblock durch NSs erfolgt sehr früh während der Infektion. Daher werden Faktoren, die erst spät in der Infektion durch NSs beeinflusst werden, wahrscheinlich nicht der Auslöser für den Exportblock sein. Demnach werden nur Nup214 und NXF1 früh in der Infektion direkt durch NSs umverteilt (Kapitel 7.3 und Kapitel 7.4.2). Auf Basis der NSs-Interaktom-Studie (158) und der Tatsache, dass Nup98 und Rae1 für eine effiziente Virusreplikation notwendig sind (Kapitel 7.2.3), lassen vermuten, dass diese Faktoren ebenfalls nicht mehr effizient am mRNA-Export beteiligt sind. Zudem führt neben NSs auch eine Depletion von Rae1, Nup98 und Nup214 zu einem Exportblock (Kapitel 7.4.4). Ebenso wurde publiziert, dass ein Fehlen von NXF1 auch zu einem

Exportblock führt (85, 102). Demnach könnte ein Einfluss von NSs auf diese Faktoren den Exportblock induzieren.

Die KLSM-Aufnahmen in (Kapitel 12.1) demonstrieren ebenfalls, dass ein *knock-down* von Rae1 neben dem Exportblock auch zu einer Ansammlung von NXF1 an der Kernmembran führt, wie es auch bei einer RVFV-Infektion, unabhängig vom Transkriptionsblock, zu beobachten ist. Diese Beobachtung ist nicht überraschend, da angenommen wird, dass Rae1 den Exportrezeptor NXF1 an Nup98 liefert, um daraufhin die mRNPs durch den NPC zu schleusen (22). Ob aber die Relokalisation von NXF1 durch eine Interaktion von NSs mit Rae1 vermittelt wird, kann mit den bisherigen Experimenten noch nicht beantwortet werden. Ferner führt ein Rae1 *knock-down* zu keiner Umverteilung der Nups und ist somit nicht relevant für die Beeinträchtigung des NPCs durch NSs.

Ein Nup98-*knock-down* hat wiederum keinen Einfluss auf die Exportfaktoren, führt allerdings zu einer Aggregatbildung von Nup358, Nup214, Nup153, Nup88 und Nup62 im Zytoplasma (Kapitel 7.4.4). Die Anwesenheit von NSs führt allerdings nur spezifisch zur Aggregatbildung von Nup214. Die Relokalisation von Nup358 früh in der Infektion wird wohl dem Transkriptionsblock geschuldet sein, oder kann eine Folge der Nup214 Relokalisation sein, da die Lokalisation von Nup358 im NPC von Nup214 abhängig ist (12). Auch wenn ein Nup98-*knock-down* effizienter ist als die potenzielle Sequestrierung von Nup98 durch NSs, scheint die Umverteilung von Nup214 womöglich nicht durch den Einfluss von NSs auf Nup98 verursacht zu sein, da keine weiteren Nups betroffen sind.

Das RVFV-NSs führt zu einer Umverteilung von Nup214 im Zytoplasma und ein Nup214-*knock-down* führt zu einer Relokalisation von Nup358 und Nup88 in das Zytoplasma und beeinflusst ebenfalls den Status von DDX19. Die Relokalisation von Nup358 durch das NSs wird demnach vermutlich durch den Transkriptionsblock und die Umverteilung durch Nup214 erfolgen. In Bezug auf Nup88 zeigen die Ergebnisse aus Kapitel 7.4 im Kontext einer RVFV-Infektion, dass sich die Level von Nup88 erst nach 24 h p. i. verringern, aber eine Umlagerung nicht zu erkennen ist. Vermutlich ist die Reduktion von Nup88 bei der Infektion daher eine Folge der Umverteilung von Nup214. Dahingegen ist die Umverteilung von DDX19 durch einen Nup214-*knock-down* nicht bei einer RVFV-Infektion zu sehen. Wie bereits erwähnt scheint ein *knock-down* effizienter als die Infektion. Zudem zeigen Experimente in Kooperation mit Michael Bauer und Urs Greber (Institut für Molekulare Biologie, Universität Zürich), dass nach einer NSs-Transfektion noch genügend Nup214 im NPC verankert ist, um den Import von Adenoviren (AdV) zu vermitteln (Daten nicht gezeigt). Der Einfluss von NSs auf Nup153 ist vermutlich rein sekundär, da dieser Effekt erst sehr spät in der Infektion auftritt und ebenso zu

beobachten ist, wenn die Zellen mit Transkriptionsinhibitoren behandelt wurden (Kapitel 7.4).

Die in Abbildung 31 schematisch zusammengefassten Ergebnisse dieser Arbeit rechtfertigen die Aussage, dass NSs über verschiedene Mechanismen direkt und indirekt den mRNA-Export stört. Zum einen kann hiernach die mögliche Interaktion von NSs mit Rae1 und Nup98 dazu führen, dass die mRNA nicht mehr effizient exportiert wird, da die Exportfaktoren eine Rolle im Replikationszyklus übernehmen. Zum anderen führt NSs spezifisch zur Aggregatbildung des Faktors Nup214 im Zytoplasma, der mit seinem N-Terminus mit NXF1 und DDX19 interagiert. Um eine Freisetzung von mRNPs zu gewährleisten, vermitteln Nup214 und DDX19 eine Konformationsänderung dieser mRNPs. Wird Nup214 nun durch NSs aus dem NPC entfernt, erfolgt demnach kein effizientes Remodellieren der mRNPs und die mRNA verbleibt im Kern. Wie es dann zu der Aggregatbildung und Umlagerung kommt ist bisher nicht geklärt und bedarf weiterer Untersuchungen. Ebenfalls wird der mRNA-Exportrezeptor NXF1 an die Kernmembran umgelagert. Ob es ein direkter Effekt ist oder ob es durch andere Faktoren vermittelt wird, kann anhand der momentanen Datenlage nicht eindeutig bestimmt werden. Da eine NXF1-Umlagerung auch bei einem Rae1-*knock-down* zu sehen ist, kann man nicht ausschließen, dass es sich hierbei um einen sekundären Effekt handelt, der ebenfalls zum mRNA-Exportblock beiträgt.

Des Weiteren beeinträchtigt das NSs indirekt durch den induzierten Transkriptionsblock die Transportmaschinerie: Nup358 und Nup153 ändern ihre Lokalisation. Es kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden, dass der induzierte Transkriptionsblock einen Einfluss auf die mRNP-Bildung hat, da das Beladen der mRNA mit Exportfaktoren kotranskriptionell erfolgt. Allerdings ist dies nicht unbedingt eine Voraussetzung für die Bildung exportkompetenter Komplexe, da Transportfaktoren auch post-transkriptional auf mRNA geladen werden können (221). Die *Shuttling*-Geschwindigkeit einiger mobiler Nups, wie Nup153 und Nup98, sowie einiger Exportfaktoren wird durch einen Transkriptionsblock herabgesetzt und kann einen Einfluss auf die Kernpore und Exportprozesse haben (65). Ob dies ebenfalls durch den NSs-induzierten Transkriptionsblock eintritt, ist noch zu untersuchen.

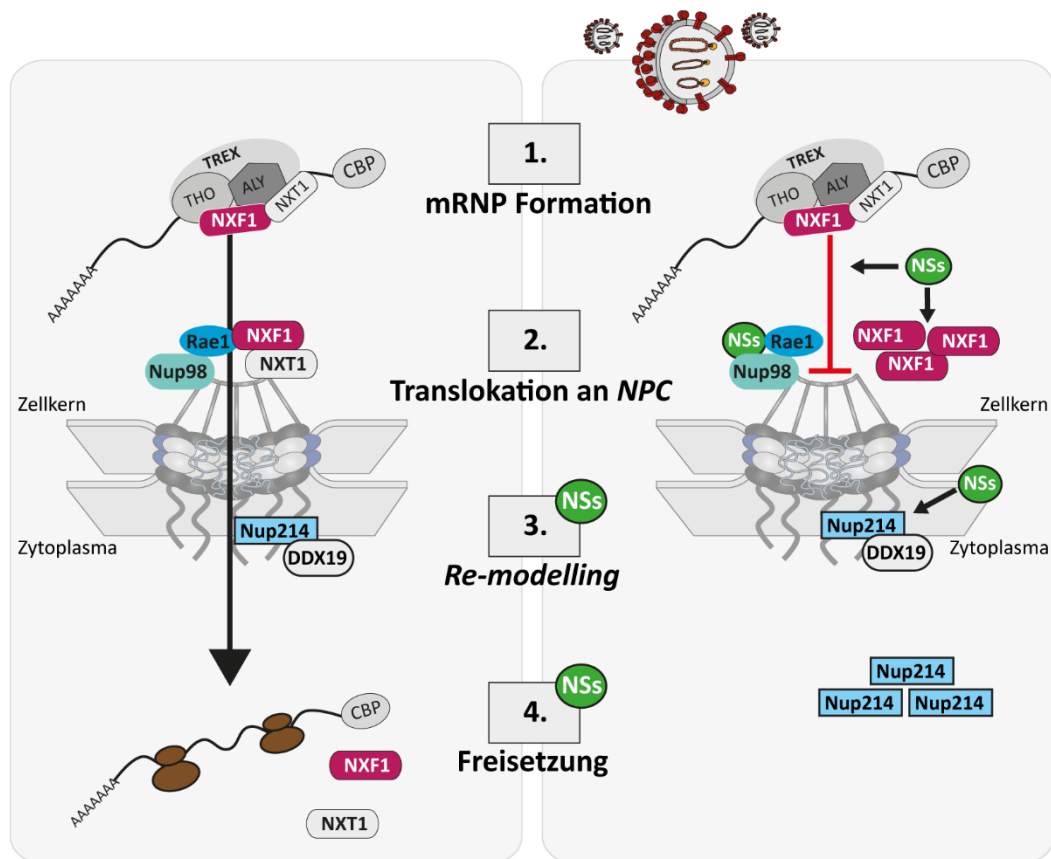


Abbildung 31 Zusammenfassung der NSs-Funktionen im zellulären mRNA-Export. Die Bildung exportfähiger mRNP-Komplexe ermöglicht das Binden des NXF1-NXT1-Exportrezeptors. Mit Hilfe von Rae1 und Nup98 erfolgt die Translokation der mRNPs an die Kernpore, wobei über Interaktionen von NXF1 mit den FG-Wiederholungen der Nups die mRNPs durch den NPC geschleust wird. Durch Nup214 und DDX19 erfolgt eine Konformationsänderung der mRNPs was dazu führt, dass die mRNA freigesetzt werden kann. NSs interagiert wahrscheinlich mit Rae1 und Nup98 und führt zu einer Akkumulation von NXF1 an der Kernmembran was den mRNA-Export beeinträchtigt. Zudem erfolgt eine Re-Lokalisation von Nup214 in das Zytoplasma, was das Remodellieren der mRNPs stört und somit die mRNA im Zellkern zurückgehalten wird.

8.1.5 *Bunyavirales*-NSs induzieren auf unterschiedliche Weise einen mRNA-Exportblock

Innerhalb der Ordnung *Bunyavirales* ist das NSs-Protein hinsichtlich der subzellulären Lokalisation und der Aminosäuresequenz mit 10 % bis 30 % nur schwach konserviert (244). Dennoch wirken diese NSs-Proteine alle als Interferon-Antagonisten, wobei sie eine Vielzahl unterschiedlicher molekularer Strategien anwenden. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Induktion eines mRNA-Exportblocks ein universeller Mechanismus der *Bunyavirales* ist. Hierfür wurden verschiedene NSs-Proteine in Zellen exprimiert. Als Vertreter der Phleboviren wurden SFSV, TOSV und PTV-A sowie PTV-B verwendet und als Vertreter der Orthobunyaviren wurde das LACV verwendet. In der Tat konnte hier gezeigt werden, dass die untersuchten NSs-Proteine alle die poly(A)-RNA der Wirtszelle

im Zellkern zurückhalten (Kapitel 7.5). Für PTV-A NSs zeigt sich eine rein nukleäre Lokalisation der mRNA, wobei diese nicht wie beim RVFV gleichmäßig ist, sondern punktförmige Aggregate ausbildet. Für PTV-B-NSs und SFSV-NSs zeigen sich neben einer gleichmäßigen nukleären Lokalisation der mRNA auch zytoplasmatische Aggregate. Für das LACV-NSs zeigt sich eine rein nukleäre und gleichmäßige Verteilung der mRNA. Ferner konnte mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen nachgewiesen werden, dass nur SFSV- und LACV-NSs eine Veränderung des NPCs verursachen. Demnach wenden die verschiedenen NSs-Proteine unterschiedliche Strategien an, um einen Exportblock zu induzieren, wobei auch schon Unterschiede in der Ausprägung des Exportblocks zu sehen sind.

In dieser Arbeit wurde zudem begonnen, den Mechanismus, wie LACV-NSs den mRNA-Exportblock induziert näher zu charakterisieren (vgl. Kapitel 7.5.1). Das LACV wird über Moskitos übertragen und verursacht in den USA eine schwere Meningoenzephalitis hauptsächlich bei Kindern (75). Für LACV-NSs ist bereits bekannt, dass es der IFN-Induktion entgegenwirkt, indem es die zelluläre Transkription hemmt. Dies geschieht durch den proteasomalen Abbau der großen Untereinheit der RNA-Polymerase II (194). Interessanterweise zeigt sich in dieser Arbeit, dass neben dem LACV auch das LACVdeINSs eine Retention der mRNA und die folglich Umverteilung des PABP induziert, auch wenn dies für LACVdeINSs weniger stark ausgeprägt ist (Kapitel 7.5.1). Für das Bunyamwera Virus (BUNV), einem weiteren Vertreter der Orthobunyaviren, belegten Blakqori *et al.*, dass sowohl WT-BUNV als auch BUNVdeINSs die Translation hemmen und eine nukleäre Umverteilung des PABPs verursachen, wobei es bei WT-BUNV schneller und ausgeprägter verläuft (20). Die Ergebnisse, dass die Viren ohne NSs die Translation von polyadenylierten mRNAs hemmen können und auch die nukleäre Akkumulation von PABP induzieren können legen nahe, dass andere virale Proteine an der Herunterregulierung der Translation beteiligt sind. Eine Studie von Hart *et al.* demonstrierte, dass einzeln exprimierte L- und N-Proteine auch eine gewisse Hemmung der Luziferase-Expression von einem RNA-Polymerase-II-abhängigen Promoter bewirken, wenn auch im geringeren Maße als NSs (77). Da N-Proteine der BUNV, insbesondere in mit rBUNVdeINSs-infizierten Zellen, an PABP binden deutet dies darauf hin, dass N an der Translationshemmung beteiligt sein könnte (20). Ob LACV N ebenfalls mit PABP interagiert und ebenfalls für den mRNA-Exportblock verantwortlich ist, muss noch untersucht werden.

Um herauszufinden welcher Mechanismus hinter dem induzierten Exportblock liegt, wurden im weiteren Verlauf dieser Arbeit die Level der Nups, Lamine A, B und C sowie der Exportfaktoren untersucht (Kapitel 7.5.1.1). Hier zeigt sich, dass sowohl LACV als auch LACVdeINSs eine Spaltung der Lamine verursacht, wobei die Größen der

Spaltprodukte einer Caspase-vermittelten Spaltung entsprechen. Demzufolge konnte die Spaltung der Lamine durch die Behandlung mit dem Caspase-Inhibitor Z-VAD-fmk verhindert werden. Zusätzlich kann eine Umverteilung von Nup153 durch beide Viren beobachtet werden, die allerdings nicht durch die Z-VAD-fmk-Behandlung verhindert wird. Im Bezug auf die Exportfaktoren kann ein Abbau von NXF1 und ALY durch LACV und LACVdeINSs beobachtet werden (vgl. Kapitel 7.5.1.2). Auch hier konnte eine Hemmung der Apoptose durch Z-VAD-fmk die Level von ALY und NXF1 erhöhen. Allerdings erreichen sie nicht die Level von uninfizierten Zellen. Es ist bereits bekannt, dass LACV-NSs pro-apoptotisch ist und eine rLACVdeINSs Mutante ebenfalls die Apoptose induzieren kann (21). Letztere ist allerdings nicht so stark ausgeprägt, wie bei WT-LACV. Die Autoren vermuteten einen weiteren, noch nicht charakterisierten, NSs-unabhängigen Mechanismus.

In dieser Arbeit konnte demonstriert werden, dass LACV NSs-abhängig eine Retention von poly(A)-RNA im Zellkern induziert, wobei es allerdings zusätzlich einen NSs-unabhängigen Mechanismus gibt. Dadurch, dass sowohl ALY als auch NXF1 abgebaut werden, wird die Bildung exportfähiger mRNPs verhindert, was dazu führt, dass die mRNA im Kern zurückbleibt. Zusätzlich beeinträchtigen LACV und LACVdeINSs den NPC. Zum einen wird die Integrität des Zellkernes herabgesetzt, da bedingt durch die Induktion der Apoptose die Lamine gespalten werden, zum anderen wird, unabhängig von der Apoptose, Nup153 umverteilt.

8.2 Proteintransport

Im Rahmen von Immunfluoreszenz-Analysen wurde gezeigt, dass eine RVFV-Infektion zu einer Relokalisation von Nup214 und Nup358 in das Zytoplasma führt und es später in der Infektion ebenfalls zu einer Nup88-Reduktion kommt (vgl. Kapitel 7.4). Ein Fehlen von Nup214, Nup88 und Nup358 kann nachweislich zu einem gestörten Proteintransport führen (12). Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit ebenfalls untersucht, ob eine RVFV-Infektion auch in den zellulären Proteintransport eingreift. Da das RVFV ausschließlich im Zytoplasma repliziert und nicht auf die Transportwege in und aus dem Zellkern angewiesen ist, wurde zunächst geklärt, ob es für das RVFV von Vorteil ist, den Proteintransport zu stören. Eine Unterbrechung des aktiven Transports kann nukleäre Proteine auf das Zytoplasma beschränken, wo sie für die virale RNA- und Proteinsynthese verwendet werden können. Die Hemmung des Transports kann auch den anschließenden Export von mRNAs für antivirale Faktoren blockieren, welche die Virusreplikation behindern können. Infektionen in Anwesenheit der Transportinhibitoren LMB und Ivermectin zeigen, dass ein gehemmter Protein-Transport kaum Auswirkungen

auf die Infektion mit WT-RVSV hat (Kapitel 7.6.1). Da NSs bereits in die Transkriptions- und mRNA-Exportprozesse eingreift, hat eine Hemmung des Proteintransports kaum Mehrwert. Im Gegensatz dazu steigen bei der NSs-Deletionsmutante Clone 13 die Titer, sobald die Transportwege gehemmt werden. Die Hemmung der Transportwege kann demnach für das Fehlen für NSs kompensieren und stellt somit einen Vorteil für die Virusreplikation dar.

Um zu bestimmen ob der Proteinimport durch eine RVSV-Infektion beeinträchtigt wird, wurde in dieser Arbeit ein Heterokaryon-Assay durchgeführt (Kapitel 7.6.2). Die Immunfluoreszenz-Analysen in Abbildung 26 zeigen, dass Proteine trotz einer RVSV-Infektion weiterhin in den Zellkern transportiert werden können. Dieses Ergebnis wird zusätzlich dadurch bestärkt, dass diverse Proteine nach einer RVSV-Infektion in den Zellkern gelangen können, wie z. B. PABP (vgl. Kapitel 7.3, Abbildung 12), IRF-3 oder p65 (14). Auch wenn Proteine weiterhin in den Zellkern gelangen, bedeutet dies nicht zwangsläufig, dass das NSs keinen Einfluss auf den Proteinimport hat. Die hier verwendete Methode zeigt nur, ob Proteine in der Lage sind, sich hin und her zubewegen, allerdings kann hier nicht bestimmt werden, ob die Rate des Transports herabgesetzt wird und der Transport somit ineffektiver wird. Um dies zu bestimmen, müssen FRAP (*fluorescence recovery after photobleaching*)-Analysen durchgeführt werden. Die allgemeine Methode besteht darin, eine bestimmte Zellkomponente mit einem fluoreszierenden Molekül zu markieren und im nächsten Schritt die Fluoreszenzintensität an einer Stelle zu messen. Anschließend wird an der gleichen Stelle mit einem Laserpuls eine Photobleichung durchgeführt bei dem die fluoreszierenden Moleküle irreversibel in einen nicht-fluoreszierenden Zustand übergehen. Durch Diffusion oder aktive Bewegung von Molekülen innerhalb der Zelle werden gebleichte Fluorophore durch die ungebleichten Moleküle ersetzt. Die Diffusionskonstante kann durch die Messung des Verlaufs der Fluoreszenzintensität ermittelt werden. Wird in infizierten Zellen die ursprüngliche Intensität später erreicht als in nicht-infizierten Zellen, bedeutet dies, dass durch eine Infektion die Proteine langsamer diffundieren oder transportiert werden. Hierbei muss auch noch beachtet werden, dass bereits ein Transkriptionsblock die Transportraten von Proteinen herabsetzen kann, wie es bereits für Nup153 und Nup98 gezeigt wurde (65).

8.2.1 Umlagerungen von Proteinen durch RVSV NSs

Ein weiterer Ansatz, um zu beantworten, ob der Proteintransport durch RVSV-NSs beeinflusst wird, bestand darin, Huh7-Zellen zu infizieren und dann zu fraktionieren. Die

zytoplasmatische und die nukleäre Fraktion wurde dann mittels Massenspektrometrie analysiert, um herauszufinden, ob sich Proteine durch eine RVFV-Infektion umlagern. Die bioinformatische Analyse in Kapitel 7.6.3 zeigt, dass NSs sowohl zu einer zytoplasmatischen Retention als auch zu einer nukleären Zurückhaltung von Wirtszellproteinen führt, die zum einen indirekt durch einen Transkriptionsblock zum anderen direkt durch das NSs vermittelt werden. Eine Umlagerung muss nicht zwangsläufig auf einen gestörten Transport zurückzuführen sein, wie es zum Beispiel bei Nup214 der Fall ist. Ebenso kann es sich auch um einen antiviralen Mechanismus, wie z. B. die Translokation von IRF-3 in den Zellkern, oder auch einen pro-viralen Mechanismus handeln, wie z.B. Rekrutierung von Ubiquitin-Ligasen.

Die massenspektrometrische Analyse ermittelt nicht nur die Anzahl der Proteine, sondern auch um welche Proteine es sich handeln. Gruppierungen in funktionale Cluster mittels der STRING-Datenbank zeigten, dass verschiedene zelluläre Prozesse betroffen sind (vgl. Kapitel 7.6.3). Da sich diese Arbeit mit RNA- und Protein-Transportwegen beschäftigt, wurde die weitere Analyse auf umgelagerte Proteine beschränkt, die in solchen Prozessen einen Einfluss haben (siehe Tabelle 21). In diesem Fall waren es die mRNA-Überwachung, die Nukleinsäurebindung und das Spliceosom. Hierbei zeigt sich, dass besonders das Spliceosom betroffen ist.

Die Verifizierung der massenspektrometrischen Analyse mittels Western Blot zeigt keine Unterschiede in den Proteinleveln (Kapitel 7.6.3). Allerdings zeigen Immunfluoreszenz-Färbungen eine NSs-spezifische Umlagerung von EFTUD2 gleichmäßig in das Zytoplasma, wobei bei Clone 13-infizierten Zellen auch eine leichte Aggregatbildung von EFTUD2 im Zytoplasma zu erkennen ist. Ebenso ist eine Beeinträchtigung von CPSF6 durch NSs (siehe Abbildung 29) zu beobachten. Zusätzlich zeigt sich eine Umlagerung der Spliceosom-Bestandteile PRPF8 und SF3B4 nach einer Infektion mit Clone 13 vom Zellkern in das Zytoplasma (Abbildung 30). Welche Rolle CPSF6, EFTUD2, PRPF8 und SF3B4 im Bezug auf den RVFV-Replikationszyklus haben, ist noch zu untersuchen.

CPSF6 ist eine Komponente des CFIm (*cleavage factor Im*)-Komplexes, der als Aktivator der 3'-Endspaltung und Polyadenylierungsprozesses fungiert, die für die Reifung der Prä-mRNA zu funktionellen mRNAs erforderlich ist (29, 183, 184, 252). Einige Gruppen haben die Spaltung und Polyadenylierung mit dem mRNA-Export in Verbindung gebracht. Beispielsweise werden Reporter-Transkripte, denen ein Polyadenylierungssignal fehlt, im Zellkern zurückgehalten (83). Ruepp *et al.* demonstrierten, dass CPSF6 mit dem mRNA-Exportrezeptor NXF1 interagiert und den mRNA-Export stimuliert (184). Sie postulieren auf Grund ihrer Daten, dass CPSF6 als Zeichen für eine korrekte Reifung des 3'-Endes dient und über die NXF1-Rekrutierung

zu einem effizienten mRNA-Export beiträgt (184). Dies macht CPSF6 ein ideales Ziel, um den mRNA Export zu stören. Cardinale *et al.* untersuchten die subnukleäre Lokalisierung und Mobilität von CPSF6 genauer. Sie zeigten, dass sich CPSF6, abhängig vom Zellzyklus, zusätzlich noch in sog. *Paraspeckles* und *nuclear speckles* (zu deutsch etwa „Kernsprenkel“) akkumuliert. *Paraspeckles* bestehen aus RNA-Elementen, wobei die Hauptelemente die lange, nicht-kodierende RNA (lncRNA) NEAT1 (*Nuclear Enriched Abundant Transcript 1*) und die RNA-Bindungsproteine sind. *Nuclear speckles* hingegen sind Kerndomänen, die sich in den Interchromatin-Regionen des Nukleoplasmas befinden, in denen prä-mRNA-Spleißfaktoren angereichert sind. Ebenso zeigten sie, dass eine Hemmung der Transkription zu intranukleären Akkumulationen von CPSF6 führt (29). In dieser Arbeit konnte diese Beobachtung bestätigt werden, da eine Behandlung mit ActD bereits nach 6 h zu einer Akkumulation von CPSF6 führt (Kapitel 7.6.3). Da RVFV-NSs zu einem Transkriptionsblock führt, wird die in dieser Arbeit beobachtete Akkumulation von CPSF6 höchstwahrscheinlich ein sekundärer Effekt des Transkriptionsblocks sein. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass der Zellzyklus-Arrest durch RVFV ebenfalls zur Akkumulation von CPSF6 beiträgt. Um dies genauer zu bestimmen, müssten Färbungen mit Markern für die *Paraspeckles* (z. B. PSPC1) und *nuclear speckles* (z. B. SC-35) durchgeführt werden.

Die meisten eukaryotischen Gene werden als prä-mRNA exprimiert, die durch spleißen in mRNA umgewandelt werden. Dies ist ein wesentlicher Schritt der Genexpression, bei dem nicht-kodierende Sequenzen (sog. Introns) entfernt und kodierende Sequenzen miteinander ligiert werden. Das Spleißen der prä-mRNA wird durch das Spliceosom durchgeführt, welches aus 5 Hauptbausteinen, den snRNPs (engl.: *small nuclear ribonucleoproteins*) U1, U2, U4, U5 und U6, sowie einer Vielzahl an nicht-snRNPs besteht (144).

Die entsprechenden Untersuchungen dieser Arbeit (vgl. Kapitel 7.6.3) zeigen, dass EFTUD2, ein Bestandteil des U5 snRNPs, sich nach einer Infektion mit WT-RVFV ebenfalls diffus im Zytoplasma umlagert. Nach einer Infektion mit Clone 13 hingegen bilden sich Aggregate von EFTUD2 im Zytoplasma. Bisher konnte noch nicht bestimmt werden, was diese Umlagerungen induziert. Dadurch, dass EFTUD2 sowohl NSs-spezifisch als auch durch Clone 13 umverteilt wird, kann spekuliert werden, dass EFTUD2 als Antwort auf eine Infektion (siehe Clone 13-Infektion), und ebenfalls direkt durch NSs beeinträchtigt wird. Was diese Umlagerung von EFTUD2 zur Folge hat, gilt es noch zu beantworten. Transkriptom-Analysen von EFTUD2-*knock-down*-Zellen legen nahe, dass ein Fehlen von EFTUD2 zu einem fehlerhaften Spleißen einer bestimmten Untergruppe von prä-mRNAs mit einer weit verbreiteten Wirkung auf die Genexpression führt (242). Ebenso führt ein Fehlen von EFTUD2 zu einer verminderten LPS-induzierten

IL-6 und TNF- α -Produktion, wobei eine Überexpression von EFTUD2 die Zytokin-Expression fördert. Dies geschieht durch alternatives Spleißen von MyD88, welches durch EFTUD2 vermittelt wird. In voller Länge codiert das MyD88-Gen einen Signaladaptor für verschiedene TLR-Signalwege, wohingegen die kürzere Spleiß-Variante einen negativen Regulator kodiert, welcher dann die Aktivierung der IRAK-Proteine inhibiert (43). Bisher wurde von keiner Gruppe untersucht, ob MyD88 durch eine RVFV-Infektion alternativ gespleißt wird und dadurch die Aktivität von MyD88 beeinträchtigt wird.

Im Hinblick auf die IFN-Induktion zeigten Ermler *et al.*, unter anderem mit diesem negativen Regulator, dass die TLR-7 und TLR-8 Aktivierung und Signalgebung über das MyD88 für die RVFV-induzierte IFN-Induktion entbehrlich ist (52). Moy *et al.* vermuten, dass das MyD88 möglicherweise unbeachtete Funktionen bei der antiviralen Immunität hat, wie z. B. die Kontrolle der Autophagie und IFN-unabhängiger Signalwege (142). In diesem Zusammenhang demonstrierten sie, dass das MyD88 durch das RVFV aktiviert wird und auch erforderlich ist, um eine RVFV-Infektion einzuschränken und eine Autophagie gegen das RVFV auszulösen. Demnach verbleibt die Fragestellung, ob das RVFV den Adaptor MyD88 indirekt über EFTUD2 beeinflusst, zunächst unbeantwortet.

Im Kontext einer Virusinfektion wurde EFTUD2 bisher nur im Zusammenhang mit dem Hepatitis C Virus (HCV) untersucht. Die Studie zeigt, dass RIG-I und MDA5 durch EFTUD2 mittels alternativen Spleißens reguliert werden. Das HCV verhindert die ISG-Produktion indem es spezifisch EFTUD2 inhibiert, was wiederum die Mengen von RIG-I und MDA5 verringert und somit den TBK1- und IRF-3-Signalweg stört (251). Diese Modulation von EFTUD2, um RIG-I und MDA5 zu beeinträchtigen, wird von RVFV jedoch eher nicht verwendet, da RIG-I und MDA5 nach einer RVFV-Infektion nicht in ihrer Funktion eingeschränkt sind.

Die Proteine PRPF8 und SF3B4 sind ebenfalls Bestandteile des Spliceosoms, welche sowohl miteinander als auch mit EFTUD2 interagieren. Die Faktoren PRPF8, SF3B4 und EFTUD2 bilden exklusiv bei Clone 13 zusätzlich Aggregate im Zytoplasma (Kapitel 7.6.3). Malinová *et al.* demonstrierten, dass das Chaperon HSP90 die Bildung eines Zwischenkomplexes von PRPF8 und EFTUD2 fördert, nachdem sie im Zytoplasma synthetisiert wurden (126). Dieser Komplex, der noch weitere Komponenten enthält, wandert anschließend in den Kern. Sie zeigten ebenfalls, dass PRPF8-Mutanten, die Defekte in der Assemblierung des Zwischenkomplexes aufweisen, im Zytoplasma zurückgehalten werden. Ihre Daten legen ein Modell nahe, bei dem unvollständige Assemblierungszwischenprodukte im Zytoplasma assoziiert bleiben und nur der richtig gebildete Komplex in den Kern transloziert (126). Um sicherzustellen, dass es bei der Clone 13-Infektion ebenfalls zu diesen unvollständigen Komplexen kommt, müsste

sichergestellt werden, dass PRPF8, SF3B4 und EFTUD2 in den beobachteten Aggregaten kolokalisieren. Da der Proteinimport an sich noch funktioniert (vgl. Kapitel 7.6.2), ist es jedoch eher unwahrscheinlich, dass es sich bei den beobachteten Aggregaten um Defekte des Proteinimports handelt. Da Clone 13 kein funktionales NSs besitzt, bleibt allerdings zusätzlich die Frage offen, wie diese Beeinträchtigung der Spliceosom-Bestandteile induziert wird, und welche Folgen daraus resultieren.

Für PRPF8 konnte gezeigt werden, dass Picornavirus 3D^{Pol} in den Zellkern transloziert und mit PRPF8 assoziiert, um die mRNA-Synthese zu blocken (121). Im Kontext einer Influenza A-Infektion wurde zudem gezeigt, dass die Genexpression von PRPF8 hochreguliert wird, um so die Produktion von Viruspartikeln zu erhöhen (246). Im Zusammenhang mit Pankreaskrebs zeigte sich, dass SF3B4 die Aktivität des STAT3-Signalweges durch die Hemmung der Phosphorylierung von STAT3 beeinträchtigt. Die Überexpression von SF3B4 führt darüber hinaus zu einer Hemmung der STAT3-Aktivierung, wohingegen der Verlust von SF3B4 die Phosphorylierung von STAT3 induziert (250). Pinkham *et al.* zeigten, dass WT-RVSV zur Phosphorylierung von STAT3 führt und im Gegensatz dazu der NSs-deletierte Stamm kaum Phosphorylierung von STAT3 induziert (160). Ob es einen Zusammenhang mit der Aggregatbildung von SF3B4 durch Clone 13 und der verminderten Phosphorylierung von STAT3 gibt, muss noch geklärt werden.

Depletion von PRPF8, EFTUD2 sowie SF3B4 zeigten, dass alternatives Spleißen induziert wird (238, 242). Alternatives Spleißen ist ein Mechanismus zur Erweiterung der Proteomdiversität, wobei es auch ein wichtiger Mechanismus ist, durch den die Zelle die Genexpression posttranskriptionell steuern kann. Obwohl es bis zu diesem Zeitpunkt nicht ausführlich untersucht ist, ist es denkbar, dass dies ein wichtiger Mechanismus ist, den die Zelle zur Feinabstimmung der Genexpression nach einer Virusinfektion anwendet. Transkriptom-Analysen von Havranek *et al.* zeigten, dass eine Reihe von mRNA-Transkripten in RVSV MP-12-infizierten Zellen alternativ gespleißt werden, wobei bei drei untersuchten Kandidaten nicht-funktionale Transkripte entstanden (78). Da die Studie sich allerdings nur auf MP-12-infizierte Zellen beschränkte und z. B. kein Vergleich mit Clone 13-infizierten Zellen analysiert wurde, kann nicht gesagt werden, ob es ein RVSV-spezifischer Effekt ist oder es eine Reaktion auf die Infektion selbst ist. Daher kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass eine Infektion mit Clone 13 ebenfalls zu einem alternativen Spleißen führt.

Auch wenn die Rollen von CPSF6, EFTUD2, PRPF8 und SF3B4 im Bezug auf den RVSV-Replikationszyklus noch unklar sind, wird deutlich, dass das RVSV noch weit mehr Strategien beherrscht, um den antiviralen Mechanismen der Zelle aus dem Weg zu gehen. Neben den bereits bekannten Mechanismen, wie z. B. der Suppression der

Genexpression der Wirtszelle, zeigt diese Arbeit, dass das RVFV-NSs zusätzlich die mRNA der Wirtszelle im Zellkern zurückhält (vgl. Kapitel 7.1), um den Wettbewerb an der Translationsmaschinerie herabzusetzen. Der Exportblock wird durch eine Zerstörung des NPCs und durch die Beeinträchtigung des mRNA-Exportfaktors NXF1 induziert. NSs interagiert wahrscheinlich mit Rae1 und Nup98 und kann dadurch zum Exportblock beitragen. Zusätzlich weisen Daten aus dieser Arbeit darauf hin, dass das RVFV ebenfalls in das Spleißen von mRNAs eingreift (vgl. Kapitel 7.6.3), was wiederum Einfluss auf den mRNA-Export haben kann, sowie alternatives Spleißen induzieren kann.

8.3 Ausblick

Die Frage, ob das RVFV-NSs weitere Mechanismen anwendet, um die antiviralen Zellantwort zu umgehen, konnte in dieser Arbeit erfolgreich damit beantwortet werden, dass das NSs in den mRNA-Export und womöglich in den Spleiß-Prozess der Zelle eingreift. Dennoch werfen diese Erkenntnisse neue Fragen auf.

Diese Arbeit demonstriert, dass das RVFV-NSs einen mRNA-Exportblock polyadenylierter RNA induziert. Von besonderem Interesse ist nun, ob eine bestimmte Art von Transkripten von NSs zurückgehalten wird. Zuckerman *et al.* demonstrieren, dass eine Depletion von NXF1 und TREX verschiedene Transkriptgruppen im Kern zurückhält, wobei Transkripte mit wenigen oder langen Exons bevorzugt von NXF1 exportiert werden (254). Viele der unmittelbar frühen Gene, die als Reaktion auf Virusinfektionen wirken, haben wenige oder ein einzelnes Exon. Die Umlagerung von NXF1 durch NSs kann somit Konsequenzen für den Fortbestand von spezifischen RNAs haben. Im Kontext der Transkriptgruppen ist es von besonderem Interesse, inwieweit die hier identifizierten Komponenten des Spliceosoms, welche sich durch RVFV-Infektion umlagern, eine Rolle im RVFV-Replikationszyklus haben. Werden diese Faktoren für das RVFV rekrutiert und übernehmen eine Rolle im Replikationszyklus oder werden sie umverteilt, um das Spleißverhalten der Zelle zu modulieren? Dies ist besonders interessant, da eine beeinträchtigte Spleißeffizienz nicht nur direkt den mRNA-Export beeinflusst, sondern auch Einfluss auf antivirale Mechanismen hat, wie es z. B. für RIG-I im Falle des HCV gezeigt wurde.

Zudem ist noch nicht klar, wie es zu der Aggregatbildung von Nup214 und Nup358 im Zytoplasma kommt. Hier könnten Modifikationen wie Phosphorylierungen der Nups eine Rolle spielen. Desweiteren ist es interessant, den Effekt der strukturellen Veränderung des NPCs näher zu beleuchten. Elektronenmikroskopie oder Superresolution-Mikroskopie könnten hierbei Aufschlüsse geben. So kann z. B. ermittelt werden ob sich

der Durchmesser der Kernporen verändert und sie so gegebenenfalls durchlässiger für Moleküle wird. Zudem können FRAP-Analysen Hinweise darauf liefern, ob sich die Transportraten durch eine RVFV-Infektion verändern.

Diese Arbeit zeigt ebenfalls, dass die Strategie, einen mRNA-Exportblock zu induzieren, nicht exklusiv für das RVFV-NSs ist, sondern sie auch durch weitere Vertreter der *Bunyavirales* angewendet wird. Die verschiedenen NSs-Proteine scheinen unterschiedliche Strategien entwickelt zu haben, um einen Exportblock zu induzieren, wobei bereits Unterschiede in der Ausprägung des Exportblocks zu sehen sind. Hier sollten die möglichen Unterschiede oder Gemeinsamkeiten näher charakterisiert werden. Im Besonderen erwies sich hier das LACV als ausgesprochen interessant, da es sich im Rahmen dieser Arbeit herausgestellt hat, dass das LACV zusätzlich einen NSs-unabhängigen Weg besitzt, um mRNA im Zellkern zurückzuhalten. Die bisherigen Ergebnisse deuten darauf hin, dass dieser NSs-unabhängige Weg möglicherweise durch die Apoptose moduliert wird. Dies muss noch eindeutig geklärt und der Zusammenhang zwischen Apoptose und Exportblock näher charakterisiert werden. Für den NSs-abhängigen Weg sollte der mRNA-Exportfaktor UAP56 weiterführend untersucht werden. Denn diese Arbeit demonstrierte zwar einen Abbau von NXF1 und ALY, allerdings zeigten Kooperationspartner, dass das LACV-NSs mit dem essenziellen mRNA-Exportfaktor UAP56 interagiert (158).

Innerhalb der *Bunyavirales* ist das NSs-Protein nur schwach konserviert. Dennoch wirken alle NSs-Proteine auf unterschiedliche Weise als Interferon-Antagonisten. Zudem unterscheiden sie sich auch im Grad der Virulenz, wobei die Symptome von leichten fieberhaften Erkrankungen bis zu schweren Fällen von hämorrhagischem Fieber variieren. Die Vielfalt an IFN-antagonistischen Mechanismen dieser Viren verleitet zur Spekulation, ob eine Korrelation zwischen der NSs-Wirkung und dem Grad der Virulenz besteht. Die nähere Charakterisierung der Gemeinsamkeiten und Unterschiede der NSs-Funktionen hat demnach das Potenzial zu klären, warum manche Viren eine milde Erkrankung auslösen, während andere Infektionen zum Tode führen können.

9 Literaturverzeichnis

1. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 124(4):783–801
2. Alcázar-Román AR, Tran EJ, Guo S, Wente SR. 2006. Inositol hexakisphosphate and Gle1 activate the DEAD-box protein Dbp5 for nuclear mRNA export. *Nat. Cell Biol.* 8(7):711–16
3. Andrejeva J, Childs KS, Young DF, Carlos TS, Stock N, et al. 2004. The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101(49):17264–69
4. Askjaer P, Bachi A, Wilm M, Bischoff FR, Weeks DL, et al. 1999. RanGTP-regulated interactions of CRM1 with nucleoporins and a shuttling DEAD-box helicase. *Mol. Cell. Biol.* 19(9):6276–85
5. Austin D, Baer A, Lundberg L, Shafagati N, Schoonmaker A, et al. 2012. p53 Activation following Rift Valley Fever Virus Infection Contributes to Cell Death and Viral Production. *PLoS One*. 7(5):e36327
6. Bachi A, Braun IC, Rodrigues JP, Panté N, Ribbeck K, et al. 2000. The C-terminal domain of TAP interacts with the nuclear pore complex and promotes export of specific CTE-bearing RNA substrates. *RNA*. 6(1):136–58
7. Baer A, Austin D, Narayanan A, Popova T, Kainulainen M, et al. 2012. Induction of DNA Damage Signaling upon Rift Valley Fever Virus Infection Results in Cell Cycle Arrest and Increased Viral Replication. *J. Biol. Chem.* 287(10):7399–7410
8. Bardina M V., Lidsky P V., Sheval E V., Fominykh K V., van Kuppeveld FJM, et al. 2009. Mengovirus-Induced Rearrangement of the Nuclear Pore Complex: Hijacking Cellular Phosphorylation Machinery. *J. Virol.* 83(7):3150–61
9. Barski M, Brennan B, Miller OK, Potter JA, Vijayakrishnan S, et al. 2017. Rift valley fever phlebovirus NSs protein core domain structure suggests molecular basis for nuclear filaments. *Elife*. 6:e29236
10. Bayliss R, Littlewood T, Stewart M. 2000. Structural basis for the interaction between FxFG nucleoporin repeats and importin-beta in nuclear trafficking. *Cell*. 102(1):99–108
11. Benferhat R, Josse T, Albaud B, Gentien D, Mansuroglu Z, et al. 2012. Large-Scale Chromatin Immunoprecipitation with Promoter Sequence Microarray Analysis of the Interaction of the NSs Protein of Rift Valley Fever Virus with

- Regulatory DNA Regions of the Host Genome. *J. Virol.* 86(20):11333–44
12. Bernad R, van der Velde H, Fornerod M, Pickersgill H. 2004. Nup358/RanBP2 Attaches to the Nuclear Pore Complex via Association with Nup88 and Nup214/CAN and Plays a Supporting Role in CRM1-Mediated Nuclear Protein Export. *Mol. Cell. Biol.* 24(6):2373–84
 13. Billecocq A, Gaudiard N, Le May N, Elliott RM, Flick R, Bouloy M. 2008. RNA polymerase I-mediated expression of viral RNA for the rescue of infectious virulent and avirulent Rift Valley fever viruses. *Virology.* 378(2):377–84
 14. Billecocq A, Spiegel M, Vialat P, Kohl A, Weber F, et al. 2004. NSs Protein of Rift Valley Fever Virus Blocks Interferon Production by Inhibiting Host Gene Transcription. *J. Virol.* 78(18):9798–9806
 15. Bird BH, Albariño CG, Nichol ST. 2007. Rift Valley fever virus lacking NSm proteins retains high virulence in vivo and may provide a model of human delayed onset neurologic disease. *Virology.* 362(1):10–15
 16. Bird BH, Bawiec DA, Ksiazek TG, Shoemaker TR, Nichol ST. 2007. Highly sensitive and broadly reactive quantitative reverse transcription-PCR assay for high-throughput detection of Rift Valley fever virus. *J. Clin. Microbiol.* 45(11):3506–13
 17. Bischoff FR, Görlich D. 1997. RanBP1 is crucial for the release of RanGTP from importin beta-related nuclear transport factors. *FEBS Lett.* 419(2–3):249–54
 18. Bischoff FR, Klebe C, Kretschmer J, Wittinghofer A, Ponstingl H. 1994. RanGAP1 induces GTPase activity of nuclear Ras-related Ran. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91(7):2587–91
 19. Bischoff FR, Krebber H, Kempf T, Hermes I, Ponstingl H. 1995. Human RanGTPase-activating protein RanGAP1 is a homologue of yeast Rna1p involved in mRNA processing and transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92(5):1749–53
 20. Blakqori G, van Knippenberg I, Elliott RM. 2009. Bunyamwera Orthobunyavirus S-Segment Untranslated Regions Mediate Poly(A) Tail-Independent Translation. *J. Virol.* 83(8):3637–46
 21. Blakqori G, Weber F. 2005. Efficient cDNA-based rescue of La Crosse bunyaviruses expressing or lacking the nonstructural protein NSs. *J. Virol.* 79(16):10420–28
 22. Blevins MB, Smith AM, Phillips EM, Powers MA. 2003. Complex formation among the RNA export proteins Nup98, Rae1/Gle2, and TAP. *J. Biol. Chem.*

- 278(23):20979–88
23. Bogerd HP, Benson RE, Truant R, Herold A, Phingbodhipakkiya M, Cullen BR. 1999. Definition of a consensus transportin-specific nucleocytoplasmic transport signal. *J. Biol. Chem.* 274(14):9771–77
 24. Bolen CR, Ding S, Robek MD, Kleinstein SH. 2014. Dynamic expression profiling of type I and type III interferon-stimulated hepatocytes reveals a stable hierarchy of gene expression. *Hepatology.* 59(4):1262–72
 25. Bouloy M, Janzen C, Vialat P, Khun H, Pavlovic J, et al. 2001. Genetic evidence for an interferon-antagonistic function of rift valley fever virus nonstructural protein NSs. *J. Virol.* 75(3):1371–77
 26. Bouloy M, Weber F. 2010. Molecular biology of rift valley Fever virus. *Open Virol. J.* 4:8–14
 27. Bui KH, von Appen A, DiGuilio AL, Ori A, Sparks L, et al. 2013. Integrated structural analysis of the human nuclear pore complex scaffold. *Cell.* 155(6):1233–43
 28. Caplen H, Peters CJ, Bishop DHL. 1985. Mutagen-directed Attenuation of Rift Valley Fever Virus as a Method for Vaccine Development. *J. Gen. Virol.* 66(10):2271–77
 29. Cardinale S, Cisterna B, Bonetti P, Aringhieri C, Biggiogera M, Barabino SML. 2007. Subnuclear Localization and Dynamics of the Pre-mRNA 3 End Processing Factor Mammalian Cleavage Factor I 68-kDa Subunit. *Mol. Biol. Cell.* 18:1282–92
 30. Carnec X, Ermonval M, Kreher F, Flamand M, Bouloy M. 2014. Role of the cytosolic tails of Rift Valley fever virus envelope glycoproteins in viral morphogenesis. *Virology.* 448:1–14
 31. Chambers PG, Swanepoel R. 1980. Rift valley fever in abattoir workers. *Cent. Afr. J. Med.* 26(6):122–26
 32. Cheng H, Dufu K, Lee C-S, Hsu JL, Dias A, Reed R. 2006. Human mRNA Export Machinery Recruited to the 5' End of mRNA. *Cell.* 127(7):1389–1400
 33. Chu WM, Ostertag D, Li ZW, Chang L, Chen Y, et al. 1999. JNK2 and IKKbeta are required for activating the innate response to viral infection. *Immunity.* 11(6):721–31
 34. Ciomperlik JJ, Basta HA, Palmenberg AC. 2015. Three cardiovirus Leader proteins equivalently inhibit four different nucleocytoplasmic trafficking pathways.

Virology. 484:194–202

35. Collett MS. 1986. Messenger RNA of the M segment RNA of Rift Valley fever virus. *Virology*. 151(1):151–56
36. Copeland AM, Altamura LA, Van Deusen NM, Schmaljohn CS. 2013. Nuclear Relocalization of Polyadenylate Binding Protein during Rift Valley Fever Virus Infection Involves Expression of the NSs Gene. *J. Virol.* 87(21):11659–69
37. Copeland AM, Van Deusen NM, Schmaljohn CS. 2015. Rift Valley fever virus NSS gene expression correlates with a defect in nuclear mRNA export. *Virology*. 486:88–93
38. Crabtree MB, Kent Crockett RJ, Bird BH, Nichol ST, Erickson BR, et al. 2012. Infection and transmission of Rift Valley fever viruses lacking the NSs and/or NSm genes in mosquitoes: potential role for NSm in mosquito infection. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6(5):e1639
39. Cronshaw JM, Krutchinsky AN, Zhang W, Chait BT, Matunis MJ. 2002. Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex. *J. Cell Biol.* 158(5):915–27
40. D'Angelo MA, Hetzer MW. 2008. Structure, dynamics and function of nuclear pore complexes. *Trends Cell Biol.* 18(10):456–66
41. Daubney R, Hudson JR, Garnham PC. 1931. Enzootic hepatitis or rift valley fever. An undescribed virus disease of sheep cattle and man from east africa. *J. Pathol. Bacteriol.* 34(4):545–79
42. Davies FG, Martin V. Recognizing Rift Valley Fever. *Vet. Ital.* 42(1):31–53
43. De Arras L, Laws R, Leach SM, Pontis K, Freedman JH, et al. 2014. Comparative genomics RNAi screen identifies eftud2 as a novel regulator of innate immunity. *Genetics*. 197(2):485–96
44. de Boer SM, Kortekaas J, de Haan CAM, Rottier PJM, Moormann RJM, Bosch BJ. 2012. Heparan Sulfate Facilitates Rift Valley Fever Virus Entry into the Cell. *J. Virol.* 86(24):13767–71
45. de Boer SM, Kortekaas J, Spel L, Rottier PJM, Moormann RJM, Bosch BJ. 2012. Acid-Activated Structural Reorganization of the Rift Valley Fever Virus Gc Fusion Protein. *J. Virol.* 86(24):13642–52
46. de St Maurice A, Harmon J, Nyakarahuka L, Balinandi S, Tumusiime A, et al. 2018. Rift valley fever viral load correlates with the human inflammatory response and coagulation pathway abnormalities in humans with hemorrhagic manifestations. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 12(5):e0006460

47. Denning DP, Rexach MF. 2007. Rapid Evolution Exposes the Boundaries of Domain Structure and Function in Natively Unfolded FG Nucleoporins. *Mol. Cell. Proteomics*. 6(2):272–82
48. Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis e Sousa C. 2004. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science*. 303(5663):1529–31
49. Dzananovic E, Patel TR, Deo S, McEleney K, Stetefeld J, McKenna SA. 2013. Recognition of viral RNA stem-loops by the tandem double-stranded RNA binding domains of PKR. *RNA*. 19(3):333–44
50. Elad N, Maimon T, Frenkiel-Krispin D, Lim RY, Medalia O. 2009. Structural analysis of the nuclear pore complex by integrated approaches. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 19(2):226–32
51. Elliott RM. 1990. Molecular biology of the Bunyaviridae. *J. Gen. Virol.* 71(3):501–22
52. Ermler ME, Yerukhim E, Schriewer J, Schattgen S, Traylor Z, et al. 2013. RNA Helicase Signaling Is Critical for Type I Interferon Production and Protection against Rift Valley Fever Virus during Mucosal Challenge. *J. Virol.* 87(9):4846–60
53. Eustice M, Bond MR, Hanover JA. 2017. O -GlcNAc cycling and the regulation of nucleocytoplasmic dynamics. *Biochem. Soc. Trans.* 45(2):427–36
54. Faria PA, Chakraborty P, Levay A, Barber GN, Ezelle HJ, et al. 2005. VSV disrupts the Rae1/mrnp41 mRNA nuclear export pathway. *Mol. Cell.* 17(1):93–102
55. Fornerod M, Ohno M, Yoshida M, Mattaj IW. 1997. CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell*. 90(6):1051–60
56. Freiberg AN, Sherman MB, Morais MC, Holbrook MR, Watowich SJ. 2008. Three-Dimensional Organization of Rift Valley Fever Virus Revealed by Cryoelectron Tomography. *J. Virol.* 82(21):10341–48
57. Frey S, Görlich D. 2007. A Saturated FG-Repeat Hydrogel Can Reproduce the Permeability Properties of Nuclear Pore Complexes. *Cell*. 130(3):512–23
58. Gerrard SR, Bird BH, Albariño CG, Nichol ST. 2007. The NSm proteins of Rift Valley fever virus are dispensable for maturation, replication and infection. *Virology*. 359(2):459–65
59. Gerrard SR, Nichol ST. 2002. Characterization of the Golgi retention motif of Rift Valley fever virus G(N) glycoprotein. *J. Virol.* 76(23):12200–210

60. Gerrard SR, Nichol ST. 2007. Synthesis, proteolytic processing and complex formation of N-terminally nested precursor proteins of the Rift Valley fever virus glycoproteins. *Virology*. 357(2):124–33
61. Goldberg MW, Allen TD. 1993. The nuclear pore complex: three-dimensional surface structure revealed by field emission, in-lens scanning electron microscopy, with underlying structure uncovered by proteolysis. *J. Cell Sci.* 106 (Pt 1):261–74
62. Görlich D, Kutay U. 1999. Transport Between the Cell Nucleus and the Cytoplasm. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15(1):607–60
63. Görlich D, Panté N, Kutay U, Aebi U, Bischoff FR. 1996. Identification of different roles for RanGDP and RanGTP in nuclear protein import. *EMBO J.* 15(20):5584–94
64. Goubau D, Deddouche S, Reis e Sousa C. 2013. Cytosolic sensing of viruses. *Immunity*. 38(5):855–69
65. Griffis ER, Craige B, Dimaano C, Ullman KS, Powers MA. 2004. Distinct Functional Domains within Nucleoporins Nup153 and Nup98 Mediate Transcription-dependent Mobility. *Mol. Biol. Cell.* 15(4):1991–2002
66. Grossman E, Medalia O, Zwerger M. 2012. Functional Architecture of the Nuclear Pore Complex. *Annu. Rev. Biophys.* 41(1):557–84
67. Grünwald D, Singer RH. 2010. In vivo imaging of labelled endogenous β -actin mRNA during nucleocytoplasmic transport. *Nature*. 467(7315):604–7
68. Guidotti LG, Ishikawa T, Hobbs M V, Matzke B, Schreiber R, Chisari F V. 1996. Intracellular inactivation of the hepatitis B virus by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity*. 4(1):25–36
69. Habjan M, Andersson I, Klingström J, Schümann M, Martin A, et al. 2008. Processing of Genome 5' Termini as a Strategy of Negative-Strand RNA Viruses to Avoid RIG-I-Dependent Interferon Induction. *PLoS One*. 3(4):e2032
70. Habjan M, Penski N, Spiegel M, Weber F. 2008. T7 RNA polymerase-dependent and -independent systems for cDNA-based rescue of Rift Valley fever virus. *J. Gen. Virol.* 89(9):2157–66
71. Habjan M, Pichlmair A, Elliott RM, Overby AK, Glatter T, et al. 2009. NSs Protein of Rift Valley Fever Virus Induces the Specific Degradation of the Double-Stranded RNA-Dependent Protein Kinase. *J. Virol.* 83(9):4365–75
72. Haller O, Kochs G, Weber F. 2006. The interferon response circuit: Induction and

- suppression by pathogenic viruses. *Virology*. 344(1):119–30
73. Hamming OJ, Terczyńska-Dyla E, Vieyres G, Dijkman R, Jørgensen SE, et al. 2013. Interferon lambda 4 signals via the IFN λ receptor to regulate antiviral activity against HCV and coronaviruses. *EMBO J*. 32(23):3055–65
74. Hanover JA, Cohen CK, Willingham MC, Park MK. 1987. O-linked N-acetylglucosamine is attached to proteins of the nuclear pore. Evidence for cytoplasmic and nucleoplasmic glycoproteins. *J. Biol. Chem*. 262(20):9887–94
75. Harding S, Greig J, Mascarenhas M, Young I, Waddell LA. 2019. La Crosse virus: A scoping review of the global evidence. *Epidemiol. Infect*. 147:1-13.
76. Harmon B, Schudel BR, Maar D, Kozina C, Ikegami T, et al. 2012. Rift Valley Fever Virus Strain MP-12 Enters Mammalian Host Cells via Caveola-Mediated Endocytosis. *J. Virol*. 86(23):12954–70
77. Hart TJ, Kohl A, Elliott RM. 2009. Role of the NSs Protein in the Zoonotic Capacity of Orthobunyaviruses. *Zoonoses Public Health*. 56(6–7):285–96
78. Havranek KE, White LA, Lanchy JM, Lodmell JS. 2019. Transcriptome profiling in Rift Valley fever virus infected cells reveals modified transcriptional and alternative splicing programs. *PLoS One*. 14(5):
79. Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, et al. 2004. Species-Specific Recognition of Single-Stranded RNA via Toll-like Receptor 7 and 8. *Science (80-.)*. 303(5663):1526–29
80. Hiscott J, Pitha P, Genin P, Nguyen H, Heylbroeck C, et al. 1999. Triggering the interferon response: the role of IRF-3 transcription factor. *J. Interferon Cytokine Res*. 19(1):1–13
81. Hoch AL, Bailey CL, Gargan TP. 1985. Mechanical Transmission of Rift Valley Fever Virus by Hematophagous Diptera. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 34(1):188–93
82. Hodge CA, Tran EJ, Noble KN, Alcazar-Roman AR, Ben-Yishay R, et al. 2011. The Dbp5 cycle at the nuclear pore complex during mRNA export I: dbp5 mutants with defects in RNA binding and ATP hydrolysis define key steps for Nup159 and Gle1. *Genes Dev*. 25(10):1052–64
83. Huang Y, Carmichael GG. 1996. Role of Polyadenylation in Nucleocytoplasmic Transport of mRNA. *Mol. Cell. Biol*. 16(4):1534–42
84. Huiskonen JT, Overby AK, Weber F, Grunewald K. 2009. Electron Cryo-Microscopy and Single-Particle Averaging of Rift Valley Fever Virus: Evidence for GN-GC Glycoprotein Heterodimers. *J. Virol*. 83(8):3762–69

85. Hurt E, Sträßer K, Segref A, Bailer S, Schlaich N, et al. 2000. Mex67p mediates nuclear export of a variety of RNA polymerase II transcripts. *J. Biol. Chem.* 275(12):8361–68
86. Hutten S, Kehlenbach RH. 2007. CRM1-mediated nuclear export: to the pore and beyond. *Trends Cell Biol.* 17(4):193–201
87. Ikegami T, Makino S. 2011. The Pathogenesis of Rift Valley Fever. *Viruses.* 3(5):493–519
88. Ikegami T, Narayanan K, Won S, Kamitani W, Peters CJ, Makino S. 2009. Rift Valley Fever Virus NSs Protein Promotes Post-Transcriptional Downregulation of Protein Kinase PKR and Inhibits eIF2 α Phosphorylation. *PLoS Pathog.* 5(2):e1000287
89. Ikegami T, Narayanan K, Won S, Kamitani W, Peters CJ, Makino S. 2009. Dual Functions of Rift Valley Fever Virus NSs Protein: Inhibition of Host mRNA Transcription and Post-transcriptional Downregulation of Protein Kinase PKR. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1171:E75–85
90. Ikegami T, Won S, Peters CJ, Makino S. 2006. Rescue of Infectious Rift Valley Fever Virus Entirely from cDNA, Analysis of Virus Lacking the NSs Gene, and Expression of a Foreign Gene. *J. Virol.* 80(6):2933–40
91. Ikegami T, Won S, Peters CJ, Makino S. 2007. Characterization of Rift Valley Fever Virus Transcriptional Terminations. *J. Virol.* 81(16):8421–38
92. Ingle H, Peterson ST, Baldrige MT. 2018. Distinct Effects of Type I and III Interferons on Enteric Viruses. *Viruses.* 10(1):46
93. Iwamura T, Yoneyama M, Yamaguchi K, Suhara W, Mori W, et al. 2001. Induction of IRF-3/-7 kinase and NF-kappaB in response to double-stranded RNA and virus infection: common and unique pathways. *Genes Cells.* 6(4):375–88
94. Iwasaki A, Medzhitov R. 2004. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* 5(10):987–95
95. Jarmolowski A, Boelens WC, Izaurralde E, Mattaj IW. 1994. Nuclear export of different classes of RNA is mediated by specific factors. *J. Cell Biol.* 124(5):627–35
96. Jarnik M, Aeby U. 1991. Toward a more complete 3-D structure of the nuclear pore complex. *J. Struct. Biol.* 107(3):291–308
97. Kading RC, Crabtree MB, Bird BH, Nichol ST, Erickson BR, et al. 2014. Deletion of the NSm virulence gene of Rift Valley fever virus inhibits virus replication in and

- dissemination from the midgut of *Aedes aegypti* mosquitoes. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8(2):e2670
98. Kainulainen M, Habjan M, Hubel P, Busch L, Lau S, et al. 2014. Virulence factor NSs of Rift Valley fever virus recruits the F-box protein FBXO3 to degrade subunit p62 of general transcription factor TFIID. *J. Virol.* 88(6):3464–73
 99. Kainulainen M, Lau S, Samuel CE, Hornung V, Weber F. 2016. NSs Virulence Factor of Rift Valley Fever Virus Engages the F-Box Proteins FBXW11 and β -TRCP1 To Degrade the Antiviral Protein Kinase PKR. *J. Virol.* 90(13):6140–47
 100. Kalveram B, Lihoradova O, Ikegami T. 2011. NSs Protein of Rift Valley Fever Virus Promotes Posttranslational Downregulation of the TFIID Subunit p62. *J. Virol.* 85(13):6234–43
 101. Kalveram B, Lihoradova O, Indran S V., Lokugamage N, Head JA, Ikegami T. 2013. Rift Valley fever virus NSs inhibits host transcription independently of the degradation of dsRNA-dependent protein kinase PKR. *Virology.* 435(2):415–24
 102. Katahira J. 2012. mRNA export and the TREX complex. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* 1819(6):507–13
 103. Katahira J, Strässer K, Podtelejnikov A, Mann M, Jung JU, Hurt E. 1999. The Mex67p-mediated nuclear mRNA export pathway is conserved from yeast to human. *EMBO J.* 18(9):2593–2609
 104. Kehlenbach RH, Dickmanns A, Kehlenbach A, Guan T, Gerace L. 1999. A role for RanBP1 in the release of CRM1 from the nuclear pore complex in a terminal step of nuclear export. *J. Cell Biol.* 145(4):645–57
 105. Kendirgi F, Rexer DJ, Alcázar-Román AR, Onishko HM, Wentz SR. 2005. Interaction between the Shuttling mRNA Export Factor Gle1 and the Nucleoporin hCG1: A Conserved Mechanism in the Export of Hsp70 mRNA. *Mol. Biol. Cell.* 16(9):4304–15
 106. Kessel RG. 1983. The Structure and Function of Annulate Lamellae: Porous Cytoplasmic and Intranuclear Membranes. *Int. Rev. Cytol.* 82(C):181–303
 107. Kivinen K, Kallajoki M, Taimen P. 2005. Caspase-3 is required in the apoptotic disintegration of the nuclear matrix. *Exp. Cell Res.* 311(1):62–73
 108. Kohl A, di Bartolo V, Bouloy M. 1999. The Rift Valley Fever Virus Nonstructural Protein NSs Is Phosphorylated at Serine Residues Located in Casein Kinase II Consensus Motifs in the Carboxy-Terminus. *Virology.* 263(2):517–25
 109. Kolakofsky D, Hacker D. 1991. Bunyavirus RNA synthesis: genome transcription

- and replication. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 169:143–59
110. Kotenko S V., Gallagher G, Baurin V V., Lewis-Antes A, Shen M, et al. 2003. IFN- λ s mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat. Immunol.* 4(1):69–77
 111. Kudo N, Matsumori N, Taoka H, Fujiwara D, Schreiner EP, et al. 1999. Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96(16):9112–17
 112. Kumar GR, Shum L, Glaunsinger BA. 2011. Importin alpha-mediated nuclear import of cytoplasmic poly(A) binding protein occurs as a direct consequence of cytoplasmic mRNA depletion. *Mol. Cell. Biol.* 31(15):3113–25
 113. Kuri T, Habjan M, Penski N, Weber F. 2010. Species-independent bioassay for sensitive quantification of antiviral type I interferons. *Viol. J.* 7:50
 114. Kuss SK, Mata MA, Zhang L, Fontoura BMA. 2013. Nuclear imprisonment: Viral strategies to arrest host mRNA nuclear export. *Viruses.* 5(7):1824–49
 115. Labeaud AD, Kazura JW, King CH. 2010. Advances in Rift Valley Fever Research: Insights for Disease Prevention. *Curr Opin Infect Dis.* 23(5):403–8
 116. Laurell E, Beck K, Krupina K, Theerthagiri G, Bodenmiller B, et al. 2011. Phosphorylation of Nup98 by multiple kinases is crucial for NPC disassembly during mitotic entry. *Cell.* 144(4):539–50
 117. Le May N, Dubaele S, Proietti De Santis L, Billecocq A, Bouloy M, Egly J-M. 2004. TFIIF transcription factor, a target for the Rift Valley hemorrhagic fever virus. *Cell.* 116(4):541–50
 118. Le May N, Mansuroglu Z, Léger P, Josse T, Blot G, et al. 2008. A SAP30 Complex Inhibits IFN- β Expression in Rift Valley Fever Virus Infected Cells. *PLoS Pathog.* 4(1):e13
 119. Léger P, Tetard M, Youness B, Cordes N, Rouxel RN, et al. 2016. Differential Use of the C-Type Lectins L-SIGN and DC-SIGN for Phlebovirus Endocytosis. *Traffic.* 17(6):639–56
 120. Lévesque L, Guzik B, Guan T, Coyle J, Black BE, et al. 2001. RNA Export Mediated by Tap Involves NXT1-dependent Interactions with the Nuclear Pore Complex. *J. Biol. Chem.* 276(48):44953–62
 121. Liu YC, Kuo RL, Lin JY, Huang PN, Huang Y, et al. 2014. Cytoplasmic Viral RNA-Dependent RNA Polymerase Disrupts the Intracellular Splicing Machinery by Entering the Nucleus and Interfering with Prp8. *PLoS Pathog.* 10(6):e1004199

122. Lopez N, Muller R, Prehaud C, Bouloy M. 1995. The L protein of Rift Valley fever virus can rescue viral ribonucleoproteins and transcribe synthetic genome-like RNA molecules. *J. Virol.* 69(7):3972–79
123. Lozach P-Y, Kühbacher A, Meier R, Mancini R, Bitto D, et al. 2011. DC-SIGN as a receptor for phleboviruses. *Cell Host Microbe.* 10(1):75–88
124. Lund JM, Alexopoulou L, Sato A, Karow M, Adams NC, et al. 2004. Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101(15):5598–5603
125. Lund MK, Guthrie C. 2005. The DEAD-box protein Dbp5p is required to dissociate Mex67p from exported mRNPs at the nuclear rim. *Mol. Cell.* 20(4):645–51
126. Malinová A, Cvačková Z, Matějů D, Hořejší Z, Abéza C, et al. 2017. Assembly of the U5 snRNP component PRPF8 is controlled by the HSP90/R2TP chaperones. *J. Cell Biol.* 216(6):1579–96
127. Mamy AB El, Lo MM, Thiongane Y, Diop M, Isselmou K, et al. 2014. Comprehensive Phylogenetic Reconstructions of Rift Valley Fever Virus: The 2010 Northern Mauritania Outbreak in the *Camelus dromedarius* Species. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 14(12):856–61
128. Marcello T, Grakoui A, Barba-Spaeth G, Machlin ES, Kotenko S V., et al. 2006. Interferons α and λ Inhibit Hepatitis C Virus Replication With Distinct Signal Transduction and Gene Regulation Kinetics. *Gastroenterology.* 131(6):1887–98
129. Marié I, Durbin JE, Levy DE. 1998. Differential viral induction of distinct interferon-alpha genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7. *EMBO J.* 17(22):6660–69
130. Masuda S, Das R, Cheng H, Hurt E, Dorman N, Reed R. 2005. Recruitment of the human TREX complex to mRNA during splicing. *Genes Dev.* 19(13):1512–17
131. Matthew Michael W, Choi M, Dreyfuss G. 1995. A nuclear export signal in hnRNP A1: A signal-mediated, temperature-dependent nuclear protein export pathway. *Cell.* 83(3):415–22
132. McGavran MH, Easterday BC. 1963. Rift Valley Fever Virus Hepatitis: Light and Electron Microscopic Studies in the Mouse. *Am. J. Pathol.* 42(5):587–607
133. Meegan JM, Hoogstraal H, Moussa MI. 1979. An epizootic of Rift Valley fever in Egypt in 1977. *Vet. Rec.* 105(6):124–25
134. Mellor PS. 2000. Replication of Arboviruses in Insect Vectors. *J. Comp. Pathol.* 123(4):231–47

135. Merrick WC, Pavitt GD. 2018. Protein Synthesis Initiation in Eukaryotic Cells. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, p. a033092
136. Mogensen TH. 2009. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin. Microbiol. Rev.* 22(2):240–73
137. Mohr D, Frey S, Fischer T, Güttler T, Görlich D. 2009. Characterisation of the passive permeability barrier of nuclear pore complexes. *EMBO J.* 28(17):2541–53
138. Mordstein M, Kochs G, Dumoutier L, Renauld J-C, Paludan SR, et al. 2008. Interferon- λ Contributes to Innate Immunity of Mice against Influenza A Virus but Not against Hepatotropic Viruses. *PLoS Pathog.* 4(9):e1000151
139. Mordstein M, Neugebauer E, Ditt V, Jessen B, Rieger T, et al. 2010. Lambda interferon renders epithelial cells of the respiratory and gastrointestinal tracts resistant to viral infections. *J. Virol.* 84(11):5670–77
140. Morrill JC, Czarniecki CW, Peters CJ. 1991. Recombinant Human Interferon- γ Modulates Rift Valley Fever Virus Infection in the Rhesus Monkey. *J. Interferon Res.* 11(5):297–304
141. Morrill JC, Jennings GB, Cosgriff TM, Gibbs PH, Peters CJ. Prevention of Rift Valley fever in rhesus monkeys with interferon-alpha. *Rev. Infect. Dis.* 11 Suppl 4:S815-25
142. Moy RH, Gold B, Molleston JM, Schad V, Yanger K, et al. 2014. Antiviral autophagy restricts rift valley fever virus infection and is conserved from flies to mammals. *Immunity.* 40(1):51–65
143. Mudhasani R, Tran JP, Retterer C, Kota KP, Whitehouse CA, Bavari S. 2016. Protein Kinase R Degradation Is Essential for Rift Valley Fever Virus Infection and Is Regulated by SKP1-CUL1-F-box (SCF)FBXW11-NSs E3 Ligase. *PLOS Pathog.* 12(2):e1005437
144. Müller-Mcnicoll M, Neugebauer KM. 2013. How cells get the message: Dynamic assembly and function of mRNA-protein complexes. *Nat. Rev. Genet.* 14(4):275–87
145. Muller R, Poch O, Delarue M, Bishop DHL, Bouloy M. 1994. Rift valley fever virus L segment: correction of the sequence and possible functional role of newly identified regions conserved in RNA-dependent polymerases. *J. Gen. Virol.* 75(6):1345–52
146. Muller R, Saluzzo JF, Lopez N, Dreier T, Turell M, et al. 1995. Characterization of

- clone 13, a naturally attenuated avirulent isolate of Rift Valley fever virus, which is altered in the small segment. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 53(4):405–11
147. Nakielnny S, Dreyfuss G. 1999. Transport of proteins and RNAs in and out of the nucleus. *Cell.* 99(7):677–90
148. Nallagatla SR, Hwang J, Toroney R, Zheng X, Cameron CE, Bevilacqua PC. 2007. 5'-triphosphate-dependent activation of PKR by RNAs with short stem-loops. *Science.* 318(5855):1455–58
149. Nfon CK, Marszal P, Zhang S, Weingartl HM. 2012. Innate Immune Response to Rift Valley Fever Virus in Goats. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6(4):e1623
150. Noble KN, Tran EJ, Alcazar-Roman AR, Hodge CA, Cole CN, Wente SR. 2011. The Dbp5 cycle at the nuclear pore complex during mRNA export II: nucleotide cycling and mRNP remodeling by Dbp5 are controlled by Nup159 and Gle1. *Genes Dev.* 25(10):1065–77
151. Onoguchi K, Yoneyama M, Takemura A, Akira S, Taniguchi T, et al. 2007. Viral Infections Activate Types I and III Interferon Genes through a Common Mechanism. *J. Biol. Chem.* 282(10):7576–81
152. Ori A, Banterle N, Iskar M, Andrés-Pons A, Escher C, et al. 2013. Cell type-specific nuclear pores: a case in point for context-dependent stoichiometry of molecular machines. *Mol. Syst. Biol.* 9:648
153. Panda D, Gold B, Tartell MA, Rausch K, Casas-Tinto S, Cherry S. 2015. The transcription factor FoxK participates with Nup98 to regulate antiviral gene expression. *MBio.* 6(2):e02509-14
154. Pardigon N, Vialat P, Girard M, Bouloy M. 1982. Panhandles and hairpin structures at the termini of germiston virus RNAs (Bunyavirus). *Virology.* 122(1):191–97
155. Patel RC, Sen GC. 1998. PACT, a protein activator of the interferon-induced protein kinase, PKR. *EMBO J.* 17(15):4379–90
156. Patterson JL, Holloway B, Kolakofsky D. 1984. La Crosse virions contain a primer-stimulated RNA polymerase and a methylated cap-dependent endonuclease. *J. Virol.* 52(1):215–22
157. Pepin M, Bouloy M, Bird BH, Kemp A, Paweska J. 2010. Rift Valley fever virus (Bunyaviridae: Phlebovirus): an update on pathogenesis, molecular epidemiology, vectors, diagnostics and prevention. *Vet. Res.* 41(6):61
158. Pichlmair A, Kandasamy K, Alvisi G, Mulhern O, Sacco R, et al. 2012. Viral

- immune modulators perturb the human molecular network by common and unique strategies. *Nature*. 487(7408):486–90
159. Pichlmair A, Schulz O, Tan C-P, Rehwinkel J, Kato H, et al. 2009. Activation of MDA5 requires higher-order RNA structures generated during virus infection. *J. Virol.* 83(20):10761–69
160. Pinkham C, An S, Lundberg L, Bansal N, Benedict A, et al. 2016. The role of signal transducer and activator of transcription 3 in Rift Valley fever virus infection. *Virology*. 496:175–85
161. Pinkham C, Dahal B, de la Fuente CL, Bracci N, Beitzel B, et al. 2017. Alterations in the host transcriptome in vitro following Rift Valley fever virus infection. *Sci. Rep.* 7(1):14385
162. Piper ME, Sorenson DR, Gerrard SR. 2011. Efficient Cellular Release of Rift Valley Fever Virus Requires Genomic RNA. *PLoS One*. 6(3):e18070
163. Platanias LC. 2005. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 5(5):375–86
164. Popken P, Ghavami A, Onck PR, Poolman B, Veenhoff LM. 2015. Size-dependent leak of soluble and membrane proteins through the yeast nuclear pore complex. *Mol. Biol. Cell*. 26(7):1386–94
165. Popova TG, Turell MJ, Espina V, Kehn-Hall K, Kidd J, et al. 2010. Reverse-Phase Phosphoproteome Analysis of Signaling Pathways Induced by Rift Valley Fever Virus in Human Small Airway Epithelial Cells. *PLoS One*. 5(11):e13805
166. Prokunina-Olsson L, Muchmore B, Tang W, Pfeiffer RM, Park H, et al. 2013. A variant upstream of IFNL3 (IL28B) creating a new interferon gene IFNL4 is associated with impaired clearance of hepatitis C virus. *Nat. Genet.* 45(2):164–71
167. Proud CG. 2005. eIF2 and the control of cell physiology. *Semin. Cell Dev. Biol.* 16(1):3–12
168. Radu A, Moore MS, Blobel G. 1995. The peptide repeat domain of nucleoporin Nup98 functions as a docking site in transport across the nuclear pore complex. *Cell*. 81(2):215–22
169. Raghunayakula S, Subramonian D, Dasso M, Kumar R, Zhang X-D. 2015. Molecular Characterization and Functional Analysis of Annulate Lamellae Pore Complexes in Nuclear Transport in Mammalian Cells. *PLoS One*. 10(12):e0144508
170. Ratovonjato J, Olive M-M, Tantely LM, Andrianaivolambo L, Tata E, et al. 2011.

- Detection, Isolation, and Genetic Characterization of Rift Valley Fever Virus from *Anopheles* (*Anopheles*) *coustani* , *Anopheles* (*Anopheles*) *squamosus* , and *Culex* (*Culex*) *antennatus* of the Haute Matsiatra Region, Madagascar. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 11(6):753–59
171. Reed R, Cheng H. 2005. TREX, SR proteins and export of mRNA. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17(3):269–73
172. Reguera J, Weber F, Cusack S. 2010. Bunyaviridae RNA Polymerases (L-Protein) Have an N-Terminal, Influenza-Like Endonuclease Domain, Essential for Viral Cap-Dependent Transcription. *PLoS Pathog.* 6(9):e1001101
173. Reichelt R, Holzenburg A, Buhle EL, Jarnik M, Engel A, Aebi U. 1990. Correlation between structure and mass distribution of the nuclear pore complex and of distinct pore complex components. *J. Cell Biol.* 110(4):883–94
174. Ribbeck K, Görlich D. 2001. Kinetic analysis of translocation through nuclear pore complexes. *EMBO J.* 20(6):1320–30
175. Ribbeck K, Görlich D. 2002. The permeability barrier of nuclear pore complexes appears to operate via hydrophobic exclusion. *EMBO J.* 21(11):2664–71
176. Ribbeck K, Lipowsky G, Kent HM, Stewart M, Görlich D. 1998. NTF2 mediates nuclear import of Ran. *EMBO J.* 17(22):6587–98
177. Riblett AM, Blomen VA, Jae LT, Altamura LA, Doms RW, et al. 2016. A Haploid Genetic Screen Identifies Heparan Sulfate Proteoglycans Supporting Rift Valley Fever Virus Infection. *J. Virol.* 90(3):1414–23
178. Rice RM, Erlick BJ, Rosato RR, Eddy GA, Mohanty SB. 1980. Biochemical characterization of Rift Valley fever virus. *Virology.* 105(1):256–60
179. Roberts RM, Ezashi T, Rosenfeld CS, Ealy AD, Kubisch HM. 2003. Evolution of the interferon tau genes and their promoters, and maternal-trophoblast interactions in control of their expression. *Reprod. Suppl.* 61:239–51
180. Rothballer A, Kutay U. 2013. Poring over pores: nuclear pore complex insertion into the nuclear envelope. *Trends Biochem. Sci.* 38(6):292–301
181. Rout MP, Aitchison JD, Magnasco MO, Chait BT. 2003. Virtual gating and nuclear transport: the hole picture. *Trends Cell Biol.* 13(12):622–28
182. Rout MP, Aitchison JD, Suprpto A, Hjertaas K, Zhao Y, Chait BT. 2000. The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism. *J. Cell Biol.* 148(4):635–51

183. Rügsegger U, Blank D, Keller W. 1998. Human pre-mRNA cleavage factor Im Is related to spliceosomal SR proteins and can be reconstituted in vitro from recombinant subunits. *Mol. Cell.* 1(2):243–53
184. Ruepp MD, Aringhieri C, Vivarelli S, Cardinale S, Paro S, et al. 2009. Mammalian pre-mRNA 3' end processing factor CF Im68 functions in mRNA export. *Mol. Biol. Cell.* 20(24):5211–23
185. Saelens X, Kalai M, Vandenabeele P. 2001. Translation inhibition in apoptosis: caspase-dependent PKR activation and eIF2- α phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 276(45):41620–28
186. Sakiyama Y, Mazur A, Kapinos LE, Lim RYH. 2016. Spatiotemporal dynamics of the nuclear pore complex transport barrier resolved by high-speed atomic force microscopy. *Nat. Nanotechnol.* 11(8):719–23
187. Samuel CE. 2001. Antiviral actions of interferons. *Clin. Microbiol. Rev.* 14(4):778–809
188. Sang RC, Ahmed O, Faye O, Kelly CLH, Yahaya AA, et al. 2008. Entomologic investigations of a chikungunya virus epidemic in the Union of the Comoros, 2005. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 78(1):77–82
189. Sato M, Suemori H, Hata N, Asagiri M, Ogasawara K, et al. 2000. Distinct and Essential Roles of Transcription Factors IRF-3 and IRF-7 in Response to Viruses for IFN- α/β Gene Induction. *Immunity.* 13(4):539–48
190. Sato M, Tanaka N, Hata N, Oda E, Taniguchi T. 1998. Involvement of the IRF family transcription factor IRF-3 in virus-induced activation of the *IFN- β* gene. *FEBS Lett.* 425(1):112–16
191. Schlee M. 2013. Master sensors of pathogenic RNA – RIG-I like receptors. *Immunobiology.* 218(11):1322–35
192. Schmaljohn C, Nichol ST. 2007. *Fields Virology*. 1741–1789 pp. 5th ed.
193. Schmitt C, von Kobbe C, Bachi A, Panté N, Rodrigues JP, et al. 1999. Dbp5, a DEAD-box protein required for mRNA export, is recruited to the cytoplasmic fibrils of nuclear pore complex via a conserved interaction with CAN/Nup159p. *EMBO J.* 18(15):4332–47
194. Schoen A, Lau S, Verbruggen P, Weber F. 2020. Elongin C Contributes to RNA Polymerase II Degradation by the Interferon Antagonist NSs of La Crosse Orthobunyavirus. *J. Virol.* 94(7):e02134-19
195. Schwartz TU. 2016. The Structure Inventory of the Nuclear Pore Complex. *J. Mol.*

Biol. 428(10):1986–2000

196. Selvakumar TA, Bhushal S, Kalinke U, Wirth D, Hauser H, et al. 2017. Identification of a predominantly interferon- λ -induced transcriptional profile in murine intestinal epithelial cells. *Front. Immunol.* 8:1302
197. Sheppard P, Kindsvogel W, Xu W, Henderson K, Schlutsmeyer S, et al. 2003. IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat. Immunol.* 4(1):63–68
198. Sherman MB, Freiberg AN, Holbrook MR, Watowich SJ. 2009. Single-particle cryo-electron microscopy of Rift Valley fever virus. *Virology.* 387(1):11–15
199. Siebrasse JP, Kaminski T, Kubitscheck U. 2012. Nuclear export of single native mRNA molecules observed by light sheet fluorescence microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109(24):9426–31
200. Siniosoglou S, Wimmer C, Rieger M, Doye V, Tekotte H, et al. 1996. A novel complex of nucleoporins, which includes Sec13p and a Sec13p homolog, is essential for normal nuclear pores. *Cell.* 84(2):265–75
201. Smith EJ, Marié I, Prakash A, García-Sastre A, Levy DE. 2001. IRF3 and IRF7 Phosphorylation in Virus-infected Cells Does Not Require Double-stranded RNA-dependent Protein Kinase R or I κ B Kinase but Is Blocked by Vaccinia Virus E3L Protein. *J. Biol. Chem.* 276(12):8951–57
202. Smith RWP, Gray NK. 2010. Poly(A)-binding protein (PABP): A common viral target. *Biochem. J.* 426(1):1–11
203. Sommereyns C, Paul S, Staeheli P, Michiels T. 2008. IFN-lambda (IFN-lambda) is expressed in a tissue-dependent fashion and primarily acts on epithelial cells in vivo. *PLoS Pathog.* 4(3):e1000017
204. Stark GR, Kerr IM, Williams BRG, Silverman RH, Schreiber RD. 1998. How cells response to interferons. *Annu. Rev. Biochem.* 67(1):227–64
205. Stern-Ginossar N, Thompson SR, Mathews MB, Mohr I. 2019. Translational control in virus-infected cells. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 11(3):a033001
206. Stetson DB, Medzhitov R. 2006. Type I interferons in host defense. *Immunity.* 25(3):373–81
207. Stewart M. 2007. Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8(3):195–208
208. Stoffler D, Feja B, Fahrenkrog B, Walz J, Typke D, Aepli U. 2003. Cryo-electron tomography provides novel insights into nuclear pore architecture: implications for

- nucleocytoplasmic transport. *J. Mol. Biol.* 328(1):119–30
209. Sträßer K, Masuda S, Mason P, Pfannstiel J, Oppizzi M, et al. 2002. TREX is a conserved complex coupling transcription with messenger RNA export. *Nature.* 417(6886):304–8
210. Struthers JK, Swanepoel R. 1982. Identification of a Major Non-structural Protein in the Nuclei of Rift Valley Fever Virus-infected Cells. *J. Gen. Virol.* 60(2):381–84
211. Struthers JK, Swanepoel R, Shepherd SP. 1984. Protein synthesis in Rift Valley fever virus-infected cells. *Virology.* 134(1):118–24
212. Suhara W, Yoneyama M, Kitabayashi I, Fujita T. 2002. Direct involvement of CREB-binding protein/p300 in sequence-specific DNA binding of virus-activated interferon regulatory factor-3 holocomplex. *J. Biol. Chem.* 277(25):22304–13
213. Suntharalingam M, Wenthe SR. 2003. Peering through the pore: nuclear pore complex structure, assembly, and function. *Dev. Cell.* 4(6):775–89
214. Suzich JA, Kakach LT, Collett MS. 1990. Expression strategy of a phlebovirus: biogenesis of proteins from the Rift Valley fever virus M segment. *J. Virol.* 64(4):1549–55
215. Swanepoel R, Blackburn NK. 1977. Demonstration of Nuclear Immunofluorescence in Rift Valley Fever Infected Cells. *J. Gen. Virol.* 34(3):557–61
216. Taniguchi I, Ohno M. 2008. ATP-dependent recruitment of export factor Aly/REF onto intronless mRNAs by RNA helicase UAP56. *Mol. Cell. Biol.* 28(2):601–8
217. tenOever BR, Sharma S, Zou W, Sun Q, Grandvaux N, et al. 2004. Activation of TBK1 and IKK Kinases by Vesicular Stomatitis Virus Infection and the Role of Viral Ribonucleoprotein in the Development of Interferon Antiviral Immunity. *J. Virol.* 78(19):10636–49
218. Terasaki K, Ramirez SI, Makino S. 2016. Mechanistic Insight into the Host Transcription Inhibition Function of Rift Valley Fever Virus NSs and Its Importance in Virulence. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10(10):e0005047
219. Thimme R, Bukh J, Spangenberg HC, Wieland S, Pemberton J, et al. 2002. Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99(24):15661–68
220. Timney BL, Raveh B, Mironska R, Trivedi JM, Kim SJ, et al. 2016. Simple rules for passive diffusion through the nuclear pore complex. *J. Cell Biol.* 215(1):57–76

221. Tokunaga K, Shibuya T, Ishihama Y, Tadakuma H, Ide M, et al. 2006. Nucleocytoplasmic transport of fluorescent mRNA in living mammalian cells: nuclear mRNA export is coupled to ongoing gene transcription. *Genes to Cells*. 11(3):305–17
222. Tran EJ, Zhou Y, Corbett AH, Wentz SR. 2007. The DEAD-Box Protein Dbp5 Controls mRNA Export by Triggering Specific RNA:Protein Remodeling Events. *Mol. Cell*. 28(5):850–59
223. van Pesch V, Lanaya H, Renaud J-C, Michiels T. 2004. Characterization of the murine alpha interferon gene family. *J. Virol*. 78(15):8219–28
224. Vialat P, Billecocq A, Kohl A, Bouloy M. 2000. The S segment of rift valley fever phlebovirus (Bunyaviridae) carries determinants for attenuation and virulence in mice. *J. Virol*. 74(3):1538–43
225. Viphakone N, Hautbergue GM, Walsh M, Chang C-T, Holland A, et al. 2012. TREX exposes the RNA-binding domain of Nxf1 to enable mRNA export. *Nat. Commun*. 3(1):1006
226. Vollmer B, Antonin W. 2014. The diverse roles of the Nup93/Nic96 complex proteins – structural scaffolds of the nuclear pore complex with additional cellular functions. *Biol. Chem*. 395(5):515–28
227. von Appen A, Beck M. 2016. Structure Determination of the Nuclear Pore Complex with Three-Dimensional Cryo electron Microscopy. *J. Mol. Biol*. 428(10):2001–10
228. von Bonsdorff CH, Pettersson R. 1975. Surface structure of Uukuniemi virus. *J. Virol*. 16(5):1296–1307
229. von Moeller H, Basquin C, Conti E. 2009. The mRNA export protein DBP5 binds RNA and the cytoplasmic nucleoporin NUP214 in a mutually exclusive manner. *Nat. Struct. Mol. Biol*. 16(3):247–54
230. Wagstaff KM, Sivakumaran H, Heaton SM, Harrich D, Jans DA. 2012. Ivermectin is a specific inhibitor of importin α/β -mediated nuclear import able to inhibit replication of HIV-1 and dengue virus. *Biochem. J*. 443(3):851–56
231. Wasmoen TL, Kakach LT, Collett MS. 1988. Rift Valley fever virus M segment: cellular localization of M segment-encoded proteins. *Virology*. 166(1):275–80
232. WATSON ML. 1959. Further observations on the nuclear envelope of the animal cell. *J. Biophys. Biochem. Cytol*. 6(2):147–56
233. Weber F, Wagner V, Rasmussen SB, Hartmann R, Paludan SR. 2006. Double-

- stranded RNA is produced by positive-strand RNA viruses and DNA viruses but not in detectable amounts by negative-strand RNA viruses. *J. Virol.* 80(10):5059–64
234. Weber M, Gawanbacht A, Habjan M, Rang A, Borner C, et al. 2013. Incoming RNA Virus Nucleocapsids Containing a 5'-Triphosphorylated Genome Activate RIG-I and Antiviral Signaling. *Cell Host Microbe.* 13(3):336–46
235. Weirich CS, Erzberger JP, Flick JS, Berger JM, Thorner J, Weis K. 2006. Activation of the DEXD/H-box protein Dbp5 by the nuclear-pore protein Gle1 and its coactivator InsP6 is required for mRNA export. *Nat. Cell Biol.* 8(7):668–76
236. Wenthe SR. 2000. Gatekeepers of the nucleus. *Science.* 288(5470):1374–77
237. Wichgers Schreur PJ, Kortekaas J. 2016. Single-Molecule FISH Reveals Non-selective Packaging of Rift Valley Fever Virus Genome Segments. *PLoS Pathog.* 12(8):e1005800
238. Wickramasinghe VO, González-Porta M, Perera D, Bartolozzi AR, Sibley CR, et al. 2015. Regulation of constitutive and alternative mRNA splicing across the human transcriptome by PRPF8 is determined by 5' splice site strength. *Genome Biol.* 16(1):201
239. Wickramasinghe VO, Laskey RA. 2015. Control of mammalian gene expression by selective mRNA export. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16(7):431–42
240. Won S, Ikegami T, Peters CJ, Makino S. 2006. NSm and 78-Kilodalton Proteins of Rift Valley Fever Virus Are Nonessential for Viral Replication in Cell Culture. *J. Virol.* 80(16):8274–78
241. Won S, Ikegami T, Peters CJ, Makino S. 2007. NSm Protein of Rift Valley Fever Virus Suppresses Virus-Induced Apoptosis. *J. Virol.* 81(24):13335–45
242. Wood KA, Rowlands CF, Qureshi WMS, Thomas HB, Buczek WA, et al. 2019. Disease modeling of core pre-mRNA splicing factor haploinsufficiency. *Hum. Mol. Genet.* 28(22):3704–23
243. Wu X, Kasper LH, Mantcheva RT, Mantchev GT, Springett MJ, Van Deursen JMA. 2001. Disruption of the FG nucleoporin Nup98 causes selective changes in nuclear pore complex stoichiometry and function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98(6):3191–96
244. Wuerth JD, Weber F. 2016. Phleboviruses and the type I interferon response. *Viruses.* 8(6):174
245. Yadani FZ, Kohl A, Préhaud C, Billecocq A, Bouloy M. 1999. The carboxy-terminal

- acidic domain of Rift Valley Fever virus NSs protein is essential for the formation of filamentous structures but not for the nuclear localization of the protein. *J. Virol.* 73(6):5018–25
246. Yang CH, Li HC, Shiu YL, Ku TS, Wang CW, et al. 2017. Influenza A virus upregulates PRPF8 gene expression to increase virus production. *Arch. Virol.* 162(5):1223–35
247. Yoneyama M, Fujita T. 2010. Recognition of viral nucleic acids in innate immunity. *Rev. Med. Virol.* 20(1):4–22
248. Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, Shinobu N, Imaizumi T, et al. 2004. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat. Immunol.* 5(7):730–37
249. Yoneyama M, Onomoto K, Jogi M, Akaboshi T, Fujita T. 2015. Viral RNA detection by RIG-I-like receptors. *Curr. Opin. Immunol.* 32:48–53
250. Zhou W, Ma N, Jiang H, Rong Y, Deng Y, et al. 2017. SF3B4 is decreased in pancreatic cancer and inhibits the growth and migration of cancer cells. *Tumor Biol.* 39(3):1010428317695913
251. Zhu C, Xiao F, Hong J, Wang K, Liu X, et al. 2015. EFTUD2 Is a Novel Innate Immune Regulator Restricting Hepatitis C Virus Infection through the RIG-I/MDA5 Pathway. *J. Virol.* 89(13):6608–18
252. Zhu Y, Wang X, Forouzmand E, Jeong J, Qiao F, et al. 2018. Molecular Mechanisms for CFIm-Mediated Regulation of mRNA Alternative Polyadenylation. *Mol. Cell.* 69(1):62-74.e4
253. Zielecki F, Weber M, Eickmann M, Spiegelberg L, Zaki AM, et al. 2013. Human cell tropism and innate immune system interactions of human respiratory coronavirus EMC compared to those of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J. Virol.* 87(9):5300–5304
254. Zuckerman B, Ron M, Mikl M, Segal E, Ulitsky I. 2020. Gene Architecture and Sequence Composition Underpin Selective Dependency of Nuclear Export of Long RNAs on NXF1 and the TREX Complex. *Mol. Cell.* 19:1–17
255. Zurita M, Merino C. 2003. The transcriptional complexity of the TFIIF complex. *Trends Genet.* 19(10):578–84

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des RVFV-Partikels und seines Genoms.....	5
Abbildung 2: Schematische Darstellung des RVFV Replikationszyklus.....	7
Abbildung 3: Induktion des Typ-I- und Typ-III-Interferonsystems durch virale RNA...	12
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Kernporenkomplexes.....	19
Abbildung 5: NXF1-NXT1-vermittelter mRNA-Export.	25
Abbildung 6 KLSM-Aufnahmen zur Ermittlung der Lokalisation der poly(A)-RNA mittels Oligo(dT) <i>in situ</i> Hybridisierung.....	63
Abbildung 7 Status von Nup98 und Rae1 im Kontext einer RVFV-Infektion.	65
Abbildung 8 Verifizierung der Interaktion von NSs mit Nup98 und Rae1 mittels Co- Immunopräzipitation.....	66
Abbildung 9 Bedeutung von Nup98 für die RVFV-NSs Lokalisation.	68
Abbildung 10 Einfluss von Nup98, Rae1 und Nup62 auf die RVFV Infektion und IFN- Induktion..	70
Abbildung 11 Status wichtiger mRNA-Exportfaktoren nach einer RVFV-Infektion für 24 h.	71
Abbildung 12 Immunfluoreszenz-Aufnahmen um den Status von NXF1 und PABP nach einer RVFV-Infektion zu bestimmen.....	72
Abbildung 13 Einfluss eines NXF1 <i>knock-downs</i> auf eine RVFV-Infektion und poly(A)- RNA-Lokalisation.	74
Abbildung 14 Status der Nukleoporene nach einer RVFV-Infektion.....	77
Abbildung 15 Kernporenfärbung infizierter HeLa-Zellen.	78
Abbildung 16 Status der Lamina nach einer RVFV-Infektion	79
Abbildung 17 KLSM-Aufnahmen zur Ermittlung des Status von Nup62, Nup88, Nup98 und Nup153 nach einer RVFV Infektion.	81
Abbildung 18 Immunfluoreszenzanalysen spezifischer Nups nach einer RVFV- Infektion.	82
Abbildung 19 Bedeutung von Nup214 für eine RVFV-Infektion.	84
Abbildung 20 KLSM-Aufnahmen zum Nachweis der subzellulären Lokalisation der poly(A)-RNA in untransfizierten und NSs-transfizierten Zellen	88

Abbildung 21 Immunfluoreszenzaufnahmen zur Verifizierung des LACV-induzierten mRNA Exportblocks.....	89
Abbildung 22 Western Blot-Analysen des <i>NPCs</i> sowie der Lamine.....	91
Abbildung 23 KLSM-Aufnahmen von Nup153 nach einer LACV-Infektion..	92
Abbildung 24 Western Blot-Analyse von mRNA-Exportfaktoren.....	93
Abbildung 25 Einfluss der Transportinhibition auf eine RVFV-Infektion.	96
Abbildung 26 Heterokaryon-Assay zur Untersuchung des Protein-Transportes in RVFV-infizierten Zellen.	98
Abbildung 27 Bioinformatische Auswertung der Massenspektrometrie-Daten infizierter und fraktionierter Zellen.	100
Abbildung 28 Western Blot und KLSM-Aufnahmen zur Verifizierung der massenspektrometrischen Daten.....	102
Abbildung 29 Immunfluoreszenz-Analysen von (A) CPSF6 und (B) EFTUD2 nach einer RVFV-Infektion.....	103
Abbildung 30 Immunfluoreszenz-Analysen von PRPF8 und SF3B4 nach einer RVFV-Infektion.	104
Abbildung 31 Zusammenfassung der NSs-Funktionen im zellulären mRNA-Export.	113
Abbildung 32 KLSM-Aufnahmen um die Effekte eines <i>knock-downs</i> von Nup98, Nup214, Nup62 und Rae auf die poly(A)-RNA-Verteilung und mRNA-Exportfaktoren zu bestimmen.	147
Abbildung 33 KLSM-Aufnahmen um die Effekte eines <i>knock-downs</i> von Nup98, Nup62, Nup214 und Rae1 auf die Nups zu bestimmen.....	148

11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht und Beschreibung verwendeter Viren.	28
Tabelle 2: Übersicht über verwendete Zelllinien.	29
Tabelle 3: Reagenzien für die Kultivierung eukaryotischer Zellen.	29
Tabelle 4: Verwendete Medien und Lösungen für Zellkultur.	30
Tabelle 5: Verwendete Bakterienstämme.	30
Tabelle 6: Medien und Lösungen für prokaryotische Zellen.	31
Tabelle 7: Verwendete Antikörper für Western Blots.	32
Tabelle 8: Übersicht über verwendete Antikörper für Immunfluoreszenz-Analysen.	33
Tabelle 9: Übersicht über verwendete Primer für qRT-PCR.	35
Tabelle 10: Übersicht über verwendete Sequenzierprimer.	36
Tabelle 11: Übersicht über siRNA für knock-down Experimente.	37
Tabelle 12: Übersicht über verwendete DNA-Plasmide.	38
Tabelle 13: Übersicht über Enzyme und Längenstandards.	39
Tabelle 14: Übersicht über verwendete Kits.	40
Tabelle 15: In dieser Arbeit verwendete Puffer und Lösungen.	40
Tabelle 16: Chemikalien, Reagenzien und Verbrauchsmaterialien.	42
Tabelle 17: Geräte und Software.	45
Tabelle 18: Komponenten und PCR-Programm für Mykoplasmen-PCR.	52
Tabelle 19: Übersicht verwendeter qPCR-Programme.	55
Tabelle 20: Übersicht über die Faktoren, die durch RVFV NSs, <i>knock-down</i> oder Behandlung mit Transkriptions-Inhibitoren relokalisiert werden.	85
Tabelle 21 Auswahl an Proteinen der massenspektrometrischen Analyse die zur Verifizierung in ihrer Beteiligung beim Transportblock.	101
Tabelle 22 Anzahl der Proteine, die sich durch Infektion oder Behandlung mit Transkriptionsinhibitoren umverteilen.	149

12 Anhang

12.1 Ergänzende Daten

12.1.1 Zu Kapitel 7.4.4

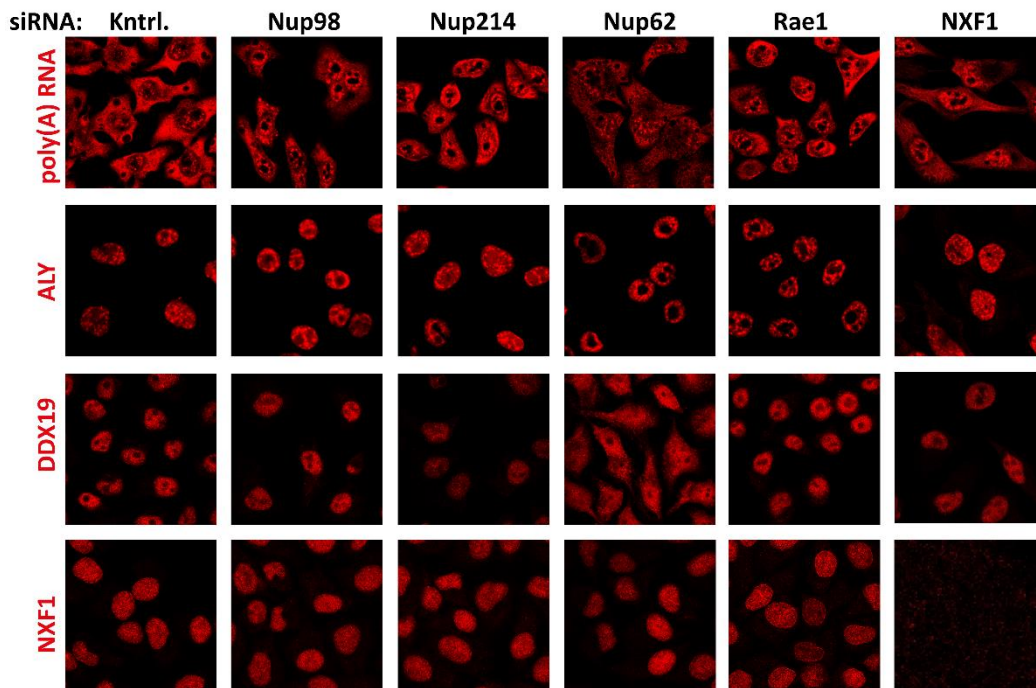


Abbildung 32 KLSM-Aufnahmen um die Effekte eines *knock-downs* von Nup98, Nup214, Nup62 und Rae auf die poly(A)-RNA-Verteilung und mRNA-Exportfaktoren zu bestimmen. HeLa-Zellen wurden zweimal mit siRNA gegen Nup98, Nup214, Nup62 und Rae1 transfiziert. Nach insgesamt 72 h wurden die Zellen fixiert und eine Oligo(dT) *in situ* Hybridisierung bzw. Färbungen gegen ALY, DDX19 und NXF1 durchgeführt.

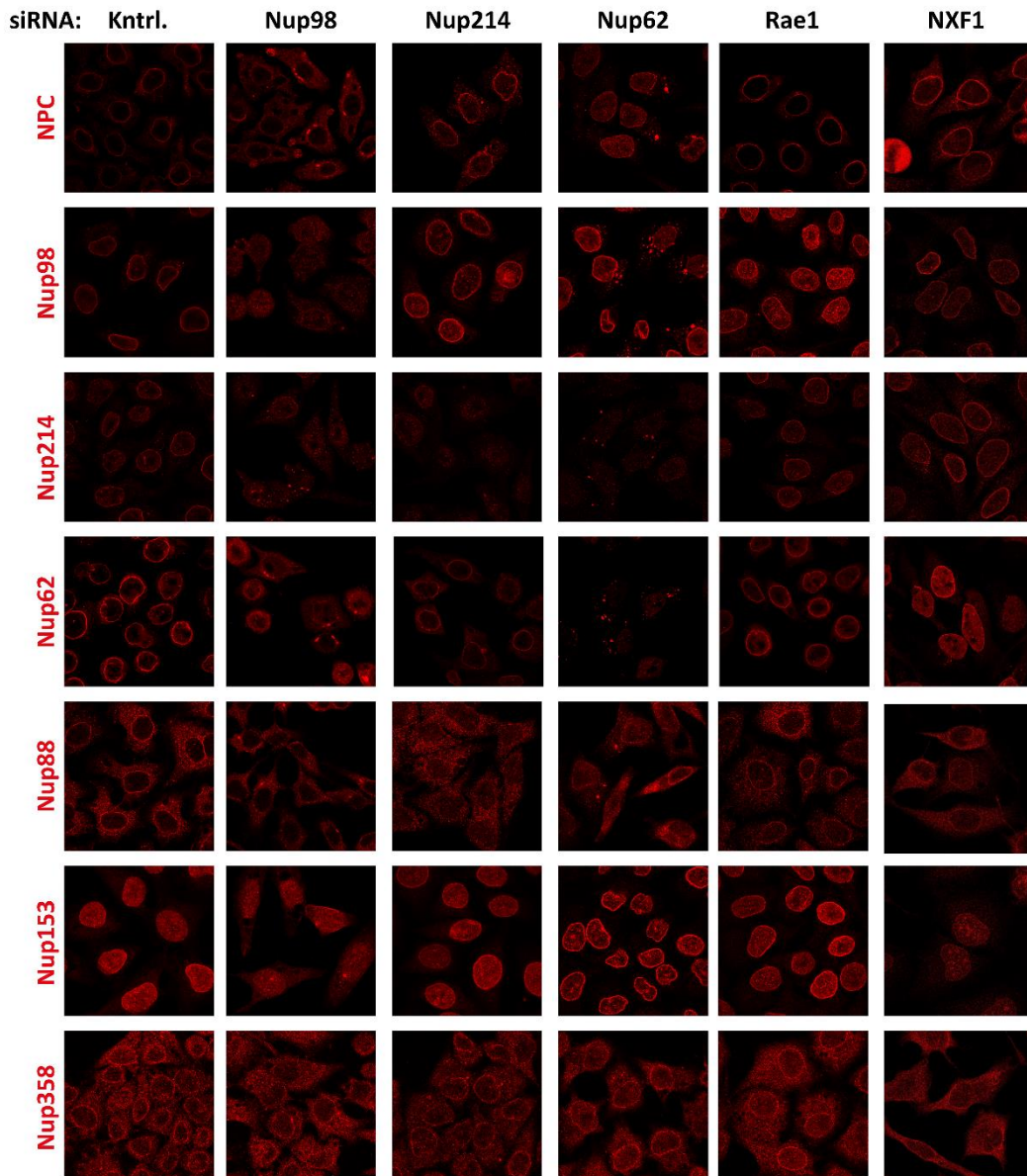


Abbildung 33 KLSM-Aufnahmen um die Effekte eines *knock-downs* von Nup98, Nup62, Nup214 und Rae1 auf die Nups zu bestimmen. HeLa-Zellen wurden zweimal mit siRNA gegen Nup98, Nup214, Nup62 und Rae1 transfiziert. Nach insgesamt 72 h wurden die Zellen fixiert und Färbungen gegen den NPC, Nup98, Nup214, Nup62, Nup88, Nup153 und Nup359 durchgeführt.

12.1.2 Zu Kapitel 7.6.3

Tabelle 22 Anzahl der Proteine, die sich durch Infektion oder Behandlung mit Transkriptionsinhibitoren umverteilen.

Behandlung	Zytoplasmatische Retention				Nukleäre Retention			
	Gesamt		Spezifisch		Gesamt		Spezifisch	
	6 h p.i.	24 h p.i.	6 h p.i.	24 h p.i.	6 h p.i.	24 h p.i.	6 h p.i.	24 h p.i.
α -Amanitin	48	92	14	19	264	177	80	93
Act D	50	157	25	58	349	103	131	43
RVFV Δ NSs	68	105	30	29	192	155	35	57
NSs-spezifisch	63	164	28	48	51	78	4	17

12.2 Lebenslauf

12.3 Verzeichnis akademischer Lehrer

Meine akademischen Lehrer:innen in Saarbrücken waren:

Bauer, Bernhardt, Deicher, Faas, Grüner, Hannemann, Heinzle, Helms, Hoth, Huber, Kallenborn, Katzmeier, Lancaster, Mues, Müller, Paulsen, Römisch, Schmitt, Veith, Walldorf, Walter, Wisser, Wöhr

Meine akademischen Lehrer:innen in Marburg waren:

Bauer, Becker, Buchholz, Eickmann, Garn, Garten, Huber, Lingelbach, Lohoff, Maisner, Pfefferle, Przyborski, Renz, Schnare, Schwarz, Slenczka, Steinhoff, Visekruna, Weber, Yu

12.4 Publikationen und Tagungsbeiträge

12.4.1 Publikationen

Virulence factor NSs of Rift Valley fever virus recruits the F-box protein FBXO3 to degrade subunit p62 of general transcription factor TFIIF

M. Kainulainen, M. Habjan, P. Hubel, L. Busch, S. Lau, J. Colinge, G. Superti-Furga, A. Pichlmair, F. Weber

J Virol. 2014 Mar;88(6):3464-73

NSs virulence factor of Rift Valley fever virus engages the F-Box proteins FBXW11 and β -TRCP to degrade the antiviral protein kinase PKR

M. Kainulainen*, S. Lau*, C.E. Samuel, F. Weber

J Virol. 2016;90(13):6140-6147

* Geteilte Erstautorenschaft

Nuclear pore protein Nup98 is involved in replication of Rift Valley fever Virus and nuclear import of virulence factor NSs

S. Lau, F. Weber

J Gen Virol. 2019;10.1099/jgv.0.001347

Elongin C contributes to RNA Polymerase II degradation by the interferon antagonist NSs of La Crosse Orthobunyavirus

A. Schoen, S. Lau, P. Verbruggen, F. Weber

J Virol. 2020;94(7):e02134-19

In Vorbereitung:

Virulence factor NSs of Rift Valley fever virus disassembles the nuclear pore complex

S. Lau, F. Weber

12.4.2 Tagungsbeiträge

12.4.2.1 Mündliche Präsentationen

10/2017 Rift Valley fever virus NSs virulence factor disrupts the nuclear pore complex

Simone Lau, Matthias Habjan, Giulio Superti-Furga, Andreas Pichlmair, Friedemann Weber

8th European Meeting on viral zoonoses, St. Raphael, Frankreich

03/2018 Rift Valley fever virus NSs virulence factor disrupts the nuclear pore complex

Simone Lau, Matthias Habjan, Giulio Superti-Furga, Andreas Pichlmair, Friedemann Weber

28. jährliche Tagung der Gesellschaft für Virologie (GfV) in Würzburg

03/2019 Knocking at the nuclear door: Rift Valley fever virus virulence factor NSs targets nuclear-cytoplasmic transport

Simone Lau, Axel Weber, Uwe Linne, Michael Kracht, Friedemann Weber

29. jährliche Tagung der Gesellschaft für Virologie (GfV) in Düsseldorf;

12.4.2.2 Posterpräsentationen

03/2015 The virulence factor NSs of Rift Valley fever virus induces messenger RNA export block

Simone Lau, Matthias Habjan, Andreas Pichlmair, Markus Kainulainen, Friedemann Weber

25. jährliche Tagung der Gesellschaft für Virologie (GfV) in Bochum

03/2016 Rift Valley fever virus NSs virulence factor blocks the nuclear export of host mRNAs

Simone Lau, Matthias Habjan, Giulio Superti-Furga, Andreas Pichlmair, Markus Kainulainen, Friedemann Weber

26. jährliche Tagung der Gesellschaft für Virologie (GfV) in Münster

03/2017 Rift Valley fever virus NSs virulence factor blocks the nuclear export of host mRNAs

Simone Lau, Matthias Habjan, Giulio Superti-Furga, Andreas Pichlmair, Markus Kainulainen, Friedemann Weber

27. jährliche Tagung der Gesellschaft für Virologie (GfV) in Marburg

06/2018 Knocking at the nuclear door: Rift Valley fever virus virulence factor NSs targets nuclear-cytoplasmic transport

Simone Lau, Matthias Habjan, Giulio Superti-Furga, Andreas Pichlmair, Friedemann Weber

The 2018 Negative Strand RNA Virus (NSV) meeting, Verona, Italien

04/2019 Knocking at the nuclear door: Rift Valley fever virus virulence factor NSs targets nuclear-cytoplasmic transport

Simone Lau, Matthias Habjan, Giulio Superti-Furga, Andreas Pichlmair, Friedemann Weber

European Congress of Virology, Rotterdam, Niederlande

03/2020 Knocking at the nuclear door: Rift Valley fever virus virulence factor NSs targets nuclear-cytoplasmic transport *

Simone Lau, Axel Weber, Uwe Linne, Michael Kracht, Friedemann Weber

30. jährliche Tagung der Gesellschaft für Virologie (GfV) in Düsseldorf;

** Akzeptierter Beitrag, Tagung abgesagt wegen SARS-CoV-2*

13 Danksagung

Zum Schluss möchte ich mich noch bei all denen bedanken, die mich während der letzten Jahre unterstützt haben.

Als erstes möchte ich mich bei Prof. Dr. Friedemann Weber für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen bedanken. Lieber Friedemann, vielen Dank für die freie Hand und die Möglichkeit mein Projekt nach meinen Vorstellungen zu bearbeiten. Vielen Dank auch für die Gelegenheit, an verschiedenen nationalen und internationalen Tagungen sowie Workshops teilzunehmen.

Auch bei allen Mitgliedern und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Weber möchte ich mich bedanken.

Larissa, danke, dass du dir am Anfang die Zeit genommen hast, um mir das virologische Arbeiten zu zeigen, aber auch für die vielen schönen Kaffeepausen und Ratschläge!

Ich möchte mich auch bei allen Studenten bedanken, die mich in meiner Forschung unterstützt haben: Lucia, Clara und Sebastian. Ein weiter großer Dank geht an Laura. Danke für deine großartige Unterstützung. Es hat sehr Spaß gemacht mit dir zu arbeiten!

Ein besonderer herzlicher Dank geht an das Team Baguette: Stéph, Ulli, Patrick und Akis. Danke für die tolle Zusammenarbeit und die gute Laune die ihr ins Labor gebracht habt. Mit euch kam der Spaß trotz Arbeitsstress nie zu kurz!

Für Kooperationen und Bereitstellung von Plasmiden bedanke ich mich bei Uwe Linne, Axel Weber, Michael Kracht, Michael Kann, Torsten Hain, Katharina Peuckert, Michael Bauer und Urs Greber. Für die finanzielle Unterstützung möchte ich mich bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft bedanken, die diese Arbeit durch den SFB1021 finanziell unterstützt hat.

Stéph, thanks for all your advice, your open ear when I needed to vent and all the fun we had outside of the lab. Thanks for your friendship and the crazy experiences I had (and will have) with you.

Mein größter Dank geht an Sandro. Tausend Dank, dass du an mich glaubst und mich bei allem unterstützt, was ich mir in den Kopf setze. Ich freue mich schon auf alles was wir in Zukunft zusammen erleben werden!

14 Ehrenwörtliche Erklärung